

OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER I FÆRINGEHAVN, MALENEBUGTEN OG KIGDLUT ILUAT



VANDKVALITETSINSTITUTTET ATV
GRØNLANDS FISKERIUNDERSØGELSER

OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER

I

FÆRINGEHAVN

MALENEBUGT

OG

KIGDLUT ILUAT

RAPPORT TIL MINISTERIET FOR GRØNLAND

JANUAR 1978

*K. Krongaard Kristensen
Vandkvalitetsinstituttet, ATV
Agern Allé 11 - 2970 Hørsholm*

og

*Hanne Petersen
Grønlands Fiskeriundersøgelser
Jægersborg Allé 1B - 2920 Charlottenlund*

0.	INDHOLDSFORTEGNELSE	SIDE
1.	RESUME	1
1.1	DANSK RESUME	1
1.2	SUMMARY	3
2.	INDLEDNING	5
2.1	BESKRIVELSE AF FARVAND	6
2.2	MIKROBIEL NEDBRYDNING AF OLIE	9
2.2.1	Indledning	9
2.2.2	Egenskaber ved olien, som er af betydning for den mikrobielle nedbrydning	14
2.2.3	Egenskaber ved miljøet, som er af betydning for oliens nedbrydning	18
2.2.4	Principper i den mikrobiologiske nedbrydning af olie	27
2.2.5	Komplet-inkomplet nedbrydning af olien	30
2.3	BESTEMMELSE AF OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER	32
2.3.1	Indledning	32
2.3.2	Kvantitative bestemmelser af olienedbrydende mikroorganismer	32
2.3.3	Kvalitative bestemmelser af olie- nedbrydende mikroorganismer	38
3.	METODER	39
3.1	INDSAMLING AF PRØVER	39

INDHOLDSFORTEGNELSE (fortsat)

3.2	ANALYTISKE METODER	39
3.2.1	Indledning	39
3.2.2	Tælling af totalkim på agarplader	40
3.2.3	Tælling af total antal gærceller/ svampe på agarplader	40
3.2.4	Tælling af olienedbrydende bakterier på agarplader	40
3.2.5	Tælling af olienedbrydende gær- celler og svampe på agarplader	41
3.2.6	Tælling af olienedbrydende bak- terier, svampe og gærceller på silicalgelplader	41
3.2.7	Tælling af olienedbrydende mikro- organismer ved MPN-metoder	42
3.2.8	Kvalitative bestemmelser vedrørende isolerede olienedbrydende bakterier	43
4.	RESULTATER	44
4.1	RESULTATER AF KVANTITATIVE UNDERSØGELSER OVER FOREKOMST AF TOTALKIM OG OLIENED- BRYDENDE KIM	44
4.2	RESULTATER AF KVALITATIVE UNDERSØGELSER AF ISOLEREDE, OLIENEDBRYDENDE BAKTERIE- STAMMER	49
5.	DISKUSSION OG KONKLUSION	56
6.	REKOMMANDATIONER	63
7.	LITTERATURLISTE	64

TABELFORTEGNELSE

TABEL 1	VÆSENTLIGE FAKTORER FOR MIKROBIEL NEDBRYDNING
TABEL 2	OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER
TABEL 3	OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER ISOLERET FRA CHESAPEAKE BAY
TABEL 4	OPLØSELIGHED FOR NOGLE AROMATISKE HYDROCARBONER
TABEL 5	OPLØSELIGHED I DESTILLERET VAND OG SALT VAND FOR NOGLE HYDROCARBONER
TABEL 6	RELATIV ANGIVELSE AF MIKROBIEL AKTIVITET I MINERAL- SALT-OLIE MEDIUM EFTER FORSKELLIGE INKUBATIONS- TIDER VED 4°C OG 8°C.
TABEL 7	RELATIONER MELLEM HYDROCARBONTAB I SUBSTRAT OG PROTEINPRODUKTION
TABEL 8	TÆLLINGER AF OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER UNDER ANVENDELSE AF FORSKELLIGE METODER
TABEL 9	TOTALKIM I VAND PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 10	TOTALKIM I SEDIMENT PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER

TABEL 11	TOTAL ANTAL GÆRCELLER/SVAMPE I VAND PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 12	TOTAL ANTAL GÆRCELLER/SVAMPE I SEDIMENT PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 13	ANTAL OLIENEDBRYDENDE BAKTERIER I VAND PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 14	ANTAL OLIENEDBRYDENDE BAKTERIER I SEDIMENT PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 15	ANTAL OLIENEDBRYDENDE GÆRCELLER/SVAMPE I VAND PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 16	ANTAL OLIENEDBRYDENDE GÆRCELLER/SVAMPE I SEDIMENT PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER
TABEL 17	ANTAL OLIENEDBRYDENDE KIM I VAND PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER (MPN-UNDERSØGELSE)
TABEL 18	ANTAL OLIENEDBRYDENDE KIM I SEDIMENT PÅ FORSKELLIGE PRØVESTEDER (MPN-UNDERSØGELSE)
TABEL 19	OPRINDELSE AF BAKTERIESTAMMER ISOLERET FRA SUBSTRATER MED ANVENDELSE AF OLIE SOM ENESTE KULSTOFKILDE
TABEL 20	BIOKEMISK UNDERSØGELSE AF BAKTERIESTAMMER ISOLERET FRA SUBSTRAT MED OLIE SOM ENESTE KULSTOFKILDE
TABEL 21	ISOLEREDE OLIENEDBRYDENDE BAKTERIERS VÆKST I BLANDING AF CYCLOALKANER UNDER ANVENDELSE AF FORSKELLIGE TEMPERATURER OG TIDER.

- TABEL 22 ISOLEREDE OLIENEDBRYDENDE BAKTERIERS VÆKST I
BLANDING AF AROMATISKE HYDROCARBONER UNDER AN-
VENDELSE AF FORSKELLIGE TEMPERATURER OG TIDER.
- TABEL 23 ISOLEREDE OLIENEDBRYDENDE BAKTERIERS VÆKST I
BLANDING AF ALKANER UNDER ANVENDELSE AF FOR-
SKELLIGE TEMPERATURER OG TIDER
- TABEL 24 ISOLEREDE OLIENEDBRYDENDE BAKTERIERS VÆKST I
BLANDING AF ALKANER, CYCLOALKANER, AROMATISKE
HYDROCARBONER UNDER ANVENDELSE AF FORSKELLIGE
TEMPERATURER OG TIDER.

FIGURFORTEGNELSE

- FIGUR 1 STATIONSKORT
Lokalitet 1 = Færingehavn
Lokalitet 2 = Kigdlut Iluat
Lokalitet 3 = Malenebugt, Godthåb
- FIGUR 2 OXIDATION AF AROMATISKE FORBINDELSER AF
PSEUDOMONAS PUTIDA
- FIGUR 3 NEDBRYDNING AF OLIE VED FORSKELLIGE
KVÆLSTOFMÆNGDER
- FIGUR 4 BAKTERIEUDVIKLING VED NEDBRYDNING AF OLIE
VED FORSKELLIGE KVÆLSTOFMÆNGDER
- FIGUR 5a + b NEDBRYDNING AF OLIE AF BAKTERIESTAMME VED
FORSKELLIGE TEMPERATURER
- FIGUR 6 FORDAMPNINGSTAB OG BIOLOGISK NEDBRYDNING VED
FORSKELLIGE TEMPERATURER
- FIGUR 7 VÆKST VED 4⁰C AF BLANDINGSKULTUR AF BAKTERIER
PÅ N-HEXADECAN VED 1 ATM. OG 500 ATM.
- FIGUR 8 CYCLOHEXANOLDANNELSE SOM FUNKTION AF CYCLO-
HEXAN-KONCENTRATIONER
- FIGUR 9 VARIATION I PH UNDER MIKROBIEL NEDBRYDNING AF
EKOFISK OLIE AF GÆRCELLER (SACCHAROMYCOPSIS LIPO-
LYTICA).

1. RESUME

1.1 DANSK RESUME

Som led i en række miljøundersøgelser omkring olieefterforskningen ved Vestgrønland er der foretaget undersøgelser af de mikrobielle forhold i grønlandske farvande. De her beskrevne undersøgelser udgør første del af et planlagt projekt og har til formål at undersøge, hvilke mikroorganismer der findes, og opnå kendskab til deres udbredelse samt at undersøge deres muligheder for at nedbryde forskellige fraktioner af olie i monokulturforsøg ved forskellige temperaturer.

Som undersøgelsesområde er udvalgt tre forskellige kystnære lokaliteter, hvor topografi og bundforhold ligner hinanden, men hvor belastningen med olie (petroleumshydrocarboner) er forskellig.

Der er ved undersøgelsen opnået en del laboratorietekniske erfaringer vedrørende undersøgelse af mikroorganismer. Det har således vist sig, at tælling af olienedbrydende kim bør foregå ved MPN-metoden fremfor tælling på olieagar. Hvis olieagar anvendes, skal det ske ved samtidig anvendelse af basisagar uden olietilsætning, for at kompensere for falsk positiv reaktion forårsaget af selve agaren eller urenheder i denne. Det blev ligeledes fundet, at aflæsning af monokulturforsøg bør fortsætte mindst 6 uger efter podning såvel ved 5°C som 15°C.

Undersøgelsen viste, at totalkimtal såvel som antal olienedbrydende bakterier i vand og sedimentprøver i området er relativt ringe. Der er ikke isoleret olienedbrydende svampe/gærceller fra de undersøgte områder. Mange forskellige bakteriearter med evne til nedbrydning af olie er isoleret, både kokker og stave med dominans af gramnegative stave. De dominerende gramnegative bakterier er glucose-negative

eller oxidativt glucose-nedbrydende. Der er ikke påvist humanpatogene eller fiskepatogene bakterier. Resultaterne antyder ikke olieforurening i de undersøgte områder, idet 1) antal olienedbrydende bakterier er ringe, 2) olienedbrydende svampe/gærceller ikke er påvist, og 3) antal olienedbrydende kim udgør mindre end 1% og i mange tilfælde mindre end 10/100 af totalkimtallet. Det påpeges, at disse konklusioner hviler på ret få observationer (en enkelt prøveindsamling), og at deres holdbarhed derfor bør efterprøves ved yderligere undersøgelser, f.eks. på forskellige årstider.

Ved laboratorieundersøgelser er vist, at de isolerede bakteriestammer kan vokse i saltholdige miljøer, samt at de i næringssubstrat udviser aftagende vækst fra 30°C til 5°C. Det er endvidere vist, at lagfasen (d.v.s. den tid der forløber, inden antallet af bakterier i kulturen vokser eksponentielt) er faldende ved stigende temperatur (5°C, 10°C og 15°C). Monokulturforsøg med 48 isolerede stammer viser, at disse ikke ved de valgte temperaturer (5°C, 10°C og 15°C) var aktive ved omdannelse af cycloalkaner og aromatiske hydrocarboner, men i de fleste tilfælde ved omdannelse af paraffinolie og motorolie. Disse monokulturforsøg viste endvidere, at bakteriel vækst med paraffinolie eller motorolie som eneste kulstofkilde oftest ikke visuelt kan registreres før efter 3 ugers forløb ved 5°C og 10°C. Ved 15°C kunne der i motorolie registreres vækst i 12 ud af 48 stammer i løbet af de første 2 uger, men 10 stammer udviste vækst i paraffinolie ved 15°C indenfor de første 2 uger.

1.2 SUMMARY

As a part of environmental studies initiated in connection with oil exploration off West Greenland investigations were carried out of the microbial conditions in Greenland waters. The studies reported here are the first part of a planned project and are aiming at studying which microorganisms are present, their distribution, and their ability to degrade oil in monoculture experiments at different temperatures.

Three coastal areas similar in topography and sea bottom conditions, but differing in their load with oil (petroleum hydrocarbons) were chosen as a study area.

Through the investigation was obtained some experience of the the techniques used for studying microorganisms. It was thus found that oil degrading germs should be counted by means of the MPN-method instead of counting on oil agar. If oil agar is used, base agar should be used without simultaneous adding of oil, in order to compensate for false positive response caused by the agar itself or by impurities in it. It was also found that reading of monoculture experiments should continue for at least 6 weeks after inoculation of the culture.

The investigation showed that the total number of germs as well as the number of oil degrading bacteria in seawater and sediment samples in the study area was relatively small. Oil degrading fungi/yeast cells have not been found in the study area. Many different species of bacteria with the ability of degrading oil have been isolated, both cocci and rodshaped bacteria with gramnegative rodshaped bacteria dominating. The dominating gramnegative bacteria are glucose

negative or oxidative glucose degrading. Human or fish pathogenous bacteria have not been found. The results do not indicate oil pollution in the study area, because 1) the total number of oil degrading bacteria is small, 2) oil degrading fungi/yeast cells have not been found, and 3) the total number of oil degrading germs is less than 1% and in most cases less than 1% of the total number of germs. It is pointed out that these conclusions are based on rather few observations (a single sampling), and that they should be tested by further investigations e.g. carried out at different times of the year.

Laboratory studies showed that the bacteria strains isolated are able to grow in saline environments, and that their growth rate declines when the temperature falls from 30°C to 5°C. It was further shown that the lagphase (i.e. the time passing before the number of bacteria in the culture increases exponentially) declines when the temperature is increased (5°C, 10°C and 15°C). Monoculture experiments with 48 isolated strains show that these were not active in the transformation of cycloalkanes and aromatic compounds, but paraffin oil and motor oil were attacked. These monoculture experiments also showed that bacterial growth with paraffin oil or motoroil as the only carbon source could not normally be observed visually until after 3 weeks at 5°C and 10°C. At 15°C growth could be observed in motor oil in 12 out of 48 strains within the second week, while 10 strains presented growth in paraffin oil at 15°C within 2 weeks.

2. INDLEDNING

I forbindelse med, at olieboringerne blev indledt i 1976 i vestgrønlandske farvande, er der iværksat en række miljøundersøgelser i området. Med hensyn til en generel beskrivelse af baggrunden for disse undersøgelser og af området henvises til rapporten: Hydrocarboner i sedimenter og marine organismer ved Vestgrønland /1/. Fra andre områder vides, at mikroorganismer spiller en afgørende rolle for omsætningen/nedbrydningen af olie. Det er i dette tilfælde af særlig betydning, at de grønlandske farvande tilhører den arktiske region, idet den mikrobielle omsætning af olie her vil foregå langsommere end i varmere klimazoner.

De her beskrevne undersøgelser er gennemført i samarbejde mellem Vandkvalitetsinstituttet (VKI) og Grønlands Fiskeriundersøgelser (GF) og finansieres af GF. De udgør første del af et projekt, der skal belyse de mikrobielle forhold i grønlandske farvande.

Projektet tager sigte på dels at undersøge hvilke mikroorganismer i grønlandske farvande, der er i stand til at nedbryde hydrocarboner, dels at få kendskab til organismernes udbredelse. Det er planen at foretage undersøgelser på forskellige årstider og på forskellige biotoper både i vandmasserne og sedimentet samt udføre laboratorieforsøg for at vurdere de i de grønlandske farvande forekommende mikroorganismers evne til at nedbryde oliekomponenter af forskellig kemisk struktur. Det er endelig hensigten at udføre forsøg med blandingskulturer af mikroorganismer i "naturligt" substrat (vand og sedimenter fra Grønland tilsat olier af forskellig type. Ved hjælp af gaschromatografiske undersøgelser skulle det være muligt at foretage en vurdering af den naturlige blandingsfloras potentiale med hensyn til nedbrydning af olie.

Sideløbende med de her omtalte undersøgelser er der i området i og omkring Færingehavn foretaget kemiske undersøgelser. Formålet med disse har været at belyse omfanget af den olieforurening, som er sket ved transport og anvendelse af olie i området.

Vedrørende disse undersøgelser henvises til rapporten: Hydrocarboner i sedimenter og marine organismer ved Færingehavn /2/.

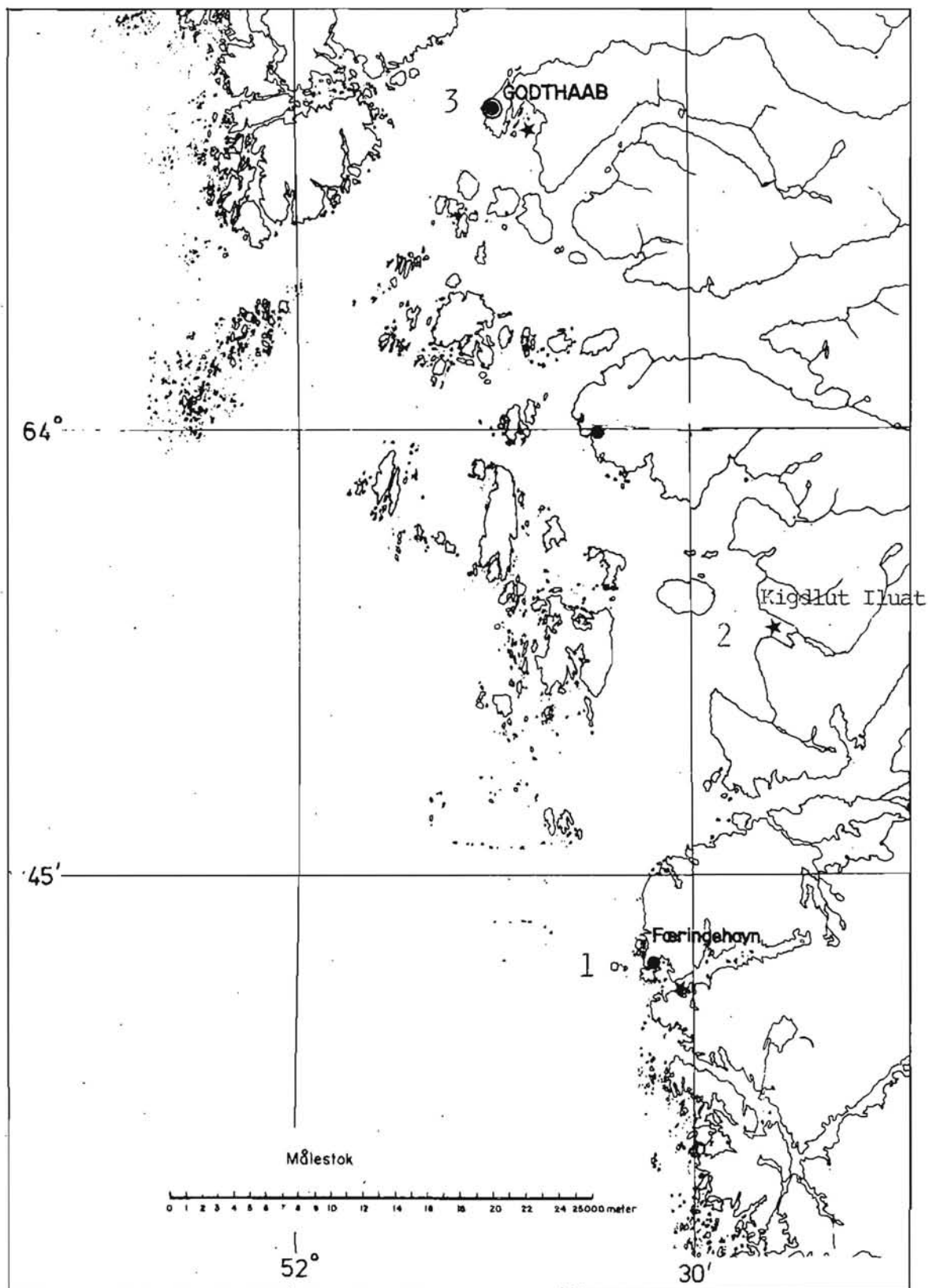
2.1 BESKRIVELSE AF FARVAND

De farvande, som er udvalgt til indsamling af mikroorganismer er kystnære områder. Tidligere undersøgelser har vist større forekomst af mikroorganismer her end i åbne havområder.

Der blev udvalgt tre forskellige lokaliteter, hvor topografien og bundforholdene ligner hinanden så meget som muligt, men hvor belastningen af olie fra omgivelserne er forskellig. En lokalitet har været udsat for olieforurening gennem flere år, en lokalitet har været udsat for moderat olieforurening fra husholdning og sejlads, og en lokalitet må betragtes som uforurennet.

Lokalitet 1: Færingehavn, Kangerdluarssoruseq (63° 41'N. 51° 31'V.) Færingehavn er beliggende ca. 56 km syd for Godthåb i en mindre fjord, Kangerdluarssoruseq (se figur 1). På denne fjords sydlige side har der gennem flere år været placeret et olietankanlæg (POLAROIL), hvorfra olieforurening jævnligt har fundet sted i forbindelse med bunkring af fiskefartøjer, tankskibe og andre skibe og i forbindelse med udtømning af tankskibes ballastvand ved anløb til havnen.

Området har således været udsat for olietilførsel gennem flere år, og prøver udtaget i dette område vil kunne give information om der eventuelt er udviklet en mikroflora domineret af "olienedbrydere". Prøverne blev udtaget i umiddelbar nærhed af POLAROILs kaj. Sedimentet i området bestod af sand med organisk materiale, og vanddybden varierede mellem 11 og 90 meter.



Figur 1. Stationskort.

Lokalitet 1 = Færingehavn

Lokalitet 2 = Kigdlut Iluat

Lokalitet 3 = Malenebugt, Godthåb

Lokalitet 2: Kigdlut iluat ($63^{\circ}53'N.51^{\circ}24'V.$)

Kigdlut Iluat er beliggende 35 km syd for Godthåb. Området er ubeboet, og bugten må anses for at være ubelastet af olieforurening. Prøver taget i dette område må antages at kunne give information om, hvor stor en del af mikrofloraen, der vil være i stand til at nedbryde hydrocarboner fra råolie, når der i området kun er hydrocarboner af biogen oprindelse tilstede. Prøverne er udtaget på dybder mellem 12 og 83 m. Sedimentet bestod af sand og silt.

Lokalitet 3: Malenebugt ($64^{\circ}10'N.51^{\circ}43'V.$)

Malenebugt er beliggende i umiddelbar nærhed af Godthåb (se figur 1). Bugten er udsat for udsivning fra lossepladsen i Godthåb, ligesom den må antages at være belastet med olie fra Godthåb skibshavn og fra sejlads i havneområdet. Denne lokalitet er dog langt mindre belastet af olieforurening end lokaliteten ved Færingehavn. Prøverne blev udtaget i forskellige dybder varierende fra 15 til 75 meter. Sedimentet bestod af sand og silt.

2.2 MIKROBIEL NEDBRYDNING AF OLIE

2.2.1 Indledning

Spørgsmålet om hvor hurtigt eller hvorvidt de enorme mængder af olie, der finder vej til marine områder (angivet til $10^6 - 10^8$ tons pr. år) vil nedbrydes under aktuelle fysisk-kemisk-biologiske betingelser, må påkalde opmærksomhed af flere grunde. Oliens biologiske konsekvenser for dyrelivet i havene, såvel som levendsmiddelhygiejniske konsekvenser er væsentlige aspekter i denne problematik.

Det er givet, at olieforureningens uheldige konsekvenser i høj grad vil være bestemt af den tid, der medgår til oliens totale eller delvise nedbrydning. Der er følgelig interesse for, ikke blot hvorvidt olie nedbrydes til CO_2 og H_2O eller intermediære nedbrydningsprodukter uden toksisk effekt i det marine miljø, men også for den hastighed, hvormed olien nedbrydes.

Indledningsvis er det derfor rimeligt at sammenstille de faktorer, der p.t. vides at være væsentlige for oliens fjernelse fra forureningsstedet eller for nedbrydning i det marine miljø. Sådanne faktorer omfatter:

- Fordampning
- Opløsning
- Emulsionsdannelse
- Foto-autooxidation
- Sedimentation
- Biologisk nedbrydning

Nogle af de nævnte faktorer som f.eks. fordampning og sedimentation er faktorer, som fjerner olie fra vandfasen, men ikke repræsenterer egentlige nedbrydningsaktiviteter. Andre faktorer, som opløsning af olie og emulsionsdannelse, er væsentlige for den mikrobielle nedbrydning.

En egentlig prioritering af de enkelte faktoreres rolle ved fjernelse og nedbrydning af olie er næppe mulig, eftersom såvel egenskaber ved selve olien, som egenskaber i det omgivende miljø, inklusive klimatiske faktorer, er medbestemmende ved en sådan prioritering. Generelt synes det dog accepteret, at den biologiske og her specielt den mikrobiologiske nedbrydning af olie spiller en helt afgørende rolle.

Tabel 1 gengiver skematisk de væsentligste faktorer for oliens nedbrydning.

<u>Substrat (olie):</u>	<u>Omgivelser (saltvand, sediment):</u>
Opløselighed	Opblanding (strøm, vind)
Oliens sammensætning	Mikrobielle ernæringsbetingelser
Indhold af toksiske stoffer	Antal og art af mikroorganismer
Emulsionsdannelse	Temperatur
Olielagets tykkelse	Iltindhold
	Tryk
	Tilstedeværelse af organisk stof

Tabel 1: Væsentlige faktorer for mikrobiel nedbrydning

Mange bakterier, gærceller og svampe besidder evnen til at udnytte hydrocarboner som eneste kulstof- og energikilde, (se tabel 2).

Pseudomonas
Flavobakterier
Vibrio
Acinetobacter
Aeromonas
Serratia
Alcaligenes
Brevibakterium
Beijerinckia
Mikrokokker
Nocardia
Arthrobacter
Mykobakterier
Corynebakterier
Actinomyces
Desulphovibrio

Svampe og gærceller af betydning for olienedbrydning

Aspergillus
Debaryomyces
Torula
Saccharomycopsis
Candida
Cladosporium
Trichosporon

Tabel 2: Olienedbrydende mikroorganismer /3, 4, 5, 6, 7, 8, 9/.

Den aktive flora ved nedbrydning af olie i jord synes at være en ganske anden end den mikroflora, som sædvanligvis virker i havvand og sediment. Modsat forholdene i jord synes svampe, gærceller og Actinomyces ikke at spille nogen større rolle i havvand /10/. Spørgsmålet om svampes betydning ved mikrobiel omsætning af olie i havvand synes ikke ganske afklaret. På områder med betydelige og hyppige olieforureninger er fundet betydelige mængder af gærceller og svampe /11/. Ved nedbrydning

af olier med toxisk effekt på bakterier kan det tænkes, at de normalt mere resistente gærceller og svampe indtager en fremtrædende rolle. Generelt har hidtidige undersøgelser mest koncentreret sig om olienedbrydende bakterier. Tabel 3 viser resultatet af en identifikation af 100 olienedbrydende bakterier isoleret fra Chesapeake Bay, USA /12/.

Pseudomonas	=	27%
Actinomyces	=	21%
Mikrokokker	=	20%
Nocardia	=	11%
Corynebakterier	=	10%
Enterobacteriaceae		6%
Andre		5%

Tabel 3: Olienedbrydende mikroorganismer isoleret fra Chesapeake Bay.

I tabel 3 er ikke nævnt *Vibrio* og flavobakterier, som i mange andre opgivelser figurerer blandt de hyppigst forekommende bakterier /15/.

Antallet af olienedbrydende kim på en given lokalitet synes markant bestemt af den forureningsmæssige situation med hensyn til olie. På ikke forurenede områder vil antallet af olienedbrydere dels være ganske ringe og dels udgøre en ringe del af total kimtal. Antallet af olienedbrydende kim er derfor en fintmærkende indikator på olieforurening /13/. Canadiske undersøgelser i Beaufort Sea viser et indhold af olienedbrydere i vandfasen på $2,3 \times 10^2$ til $9,3 \times 10^4$ celler pr. liter, svarende til 0,001% til 1,63% af total kimtal /14/. Undersøgelser i USA resulterede i fund i vandfasen på 20 celler pr. liter til 3400 celler pr. liter /13/. Rapportering om fund af op til 10^6 olienedbrydende bakterier/ml havvand i et olieforurenede område foreligger, men uden samtidig metodebeskrivelse, hvorfor opgivne tal må tages med forbehold / 3/.

I bundsedimenter er fundet olienedbrydende bakterier i mængder fra $2,7 \times 10$ til $1,6 \times 10^5$ pr. g /15/. Der forekommer iøvrigt

kun sparsomme informationer vedrørende antal olienedbrydende kim i sedimenter.

I forurenede sedimenter kan olienedbrydende kim findes i mængder $>10^5/g$ og udgøre 10% af totalalkimtal /17/.

Spørgsmålet om hvorvidt patogene bakterier kan opformeres i relation til olieforurening er et spørgsmål af betydning for humanmedicinen, levnedsmiddelhygiejnen og fiskeribiologien. Nuværende viden om disse problemer er begrænset. Interessen samler sig p.t. om *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* og *Aeromonas*. Det er kendt, at *Pseudomonas aeruginosa* kan udnytte olie som eneste kulstof- og energikilde og at særdeles høje koncentrationer af disse patogene bakterier kan opnås i olie/vandblandinger /16/.

Slægten *Vibrio* rummer flere arter af væsentlig betydning for sygdomme hos mennesker og fisk. Initiale undersøgelser på VKI viser, at den humanpatogene *Vibrio cholerae* NAG, og en *Vibrio parahæmolyticus*stamme (humanpatogen) kan udnytte olie som eneste kulstofkilde ved $10^{\circ}C - 15^{\circ}C$, men ikke ved $37^{\circ}C$, som normalt er bakteriens optimumtemperatur. Iagttagelsen er bekræftet af Statens Seruminstitut. Mere interessant i en arktisk sammenhæng er formentlig en fiskepatogen *Vibrio*, som kan udnytte olie som eneste kulstofkilde.

Eftersom fiskepatogene *Vibrio* (*V. anguillarum*) anses for mest tabvoldende smitstof i marine farvande i relation til fiske-sygdomme, og eftersom samme bakterie er bevist at vokse ved $4^{\circ}C$. /18/, kræver denne bakterie opmærksomhed. Den ikke ualmindelige fiskesygdom Fin Rot, kendt fra stærkt forurenede områder, er sat i forbindelse med olieforurening og hertil hørende opformering af fiskepatogene *Vibrio* /19/. 96% af fisk i damme i estuarier tilsat olie udviklede Fin Rot mod kun 6% i kontrolhold. *Aeromonas* er en ferskvandsbakterie, som resulterer i lignende sygdomme som *Vibrio*, og som i lighed med *Vibrio* synes at kunne udnytte olie. Blandt de olienedbrydende gærceller og svampe forekommer også repræsentanter for slægter, der vides at rumme humanpatogene arter (*Candida*, *Aspergillus*).

2.2.2 Egenskaber ved olien, som er af betydning for dens mikrobielle nedbrydning.

Oliens sammensætning er afgørende med hensyn til muligheder for nedbrydning. Paraffiner, isoparaffiner, cycloalkaner og aromatiske hydrocarboner repræsenterer bestanddele af olien med forskellig nedbrydelighed. Nedbrydelighed af hydrocarboner aftager i rækkefølgen n-alkaner, isoalkaner, aromatiske forbindelser, cycloalkaner /20/. Den procentuelle andel af de relativt let nedbrydelige paraffiner kan variere fra nær 0% til næsten 100% og er oftest < 20% af råolien. Den aromatiske fraktion udgør normalt ca. 20%, mens de særdeles vanskeligt nedbrydelige cycloalkaner udgør op til 50% af mange råolier. /25/. Monokulturer af flere svampe- og bakteriearter kan nedbryde n-alkaner og vandopløselige aromatiske hydrocarboner, mens der ikke synes isoleret bakterier, som i monokulturer kan nedbryde den dominerende cycloalkan, nemlig cyclohexan. /21/.

Denne cycloalkan kan imidlertid nedbrydes af polykulturer (jfr. afsnit 2.2.4).

I nogle olier forekommer stoffer, som hæmmer den mikrobielle aktivitet. Sådanne stoffer omfatter phenol, cyclohexan og toluen. Det må i denne forbindelse erindres, at phenoler er derivater af benzen, og at mange olienedbrydende bakterier også kan angribe phenoler /22/.

Olielagets udbredelse og dermed tykkelse er af betydning for nedbrydningen. Koncentrationen af bakterier i det øverste 10 μm af havoverfladen er 10-100 gange større end i dybere lag. Bakterietal på $10^8/\text{ml}$ eller $10^5/\text{cm}^2$ er registreret /23/. Parallelt med at det øverste lag repræsenterer en bakterie/svampe/gær-cellekoncentration, er der i samme lag tilstrækkeligt af C, N og P. Sådanne aktive biologiske lag er en væsentlig faktor for en hurtig mikrobiel omsætning af tynde oliehinder /23/.

Emulsionsdannelse. Olie og vand danner et system med to faser, hvoraf den ene - den disperse fase - findes fint fordelt i den anden - dispersionsmediet. Den lipofile fase kan udgøre enten den disperse fase, olie/vand emulsion eller dispersionsmediet vand/olie emulsion. Emulsionsdannelse er af betydning for den tilgængelige exponeringsflade for mikrobiologisk-enzymatisk aktivitet. Vind og strøm er væsentlige elementer i en sådan dannelse af emulsioner. De organiske syrer der blandt andet er resultatet af den mikrobielle omsætning af olie (se figur 9) er karakteriseret ved at have en hydrofob og en hydrofil del i molekylet, hvorved blanding af olie og vand lettes. Såvel V/O-emulsion som O/V-emulsion kan finde sted ved oliespild i havvand. V/O emulsioner ("chocolate mousse"), som de er beskrevet siden Torrey Canyon katastrofen i 1967, angives at udgøre en emulsion med ringere muligheder for tilgang af ilt og nødvendige næringsstoffer fra havvandet, og disse emulsioner vil følgelig forringe mulighederne for biologisk oxidation.

Oliens opløselighed i vand er en helt afgørende faktor med hensyn til den mikrobielle nedbrydelighed. Det synes generelt accepteret, at bakterier, gærceller og svampe udnytter hydrocarboner i opløst form. I overensstemmelse med denne antagelse er det vist, at bakteriers generationstid under anvendelse af forskellige aromatiske hydrocarboner er helt afhængige af opløselighed af vedkommende hydrocarbon. Eksperimenter viste generationstider på henholdsvis 1,5 time, 10,5 timer og 29 timer, korresponderende med opløselighed på 98 μM , 9 μM og 0,45 μM .

Undersøgelser over bionedbrydelighed af naphtalin viser, at væksthastigheden for bakterierne er uafhængig af mængden af naphtalin i mediet, forudsat mætningspunkt for opløselighed er nået. Tilstedeværelse af overskud af uopløst naphtalin synes ikke at influere på

væksthastigheden /24/. Opløseligheden synes følgelig helt afgørende for nedbrydningshastigheden. Det er imidlertid næppe tilladeligt uden videre at slutte fra eksperimenter med naphtalin til andre forbindelser af olie med andre kemiske strukturer. Teorien om opløselighed som afgørende for den mikrobielle nedbrydelighed er imidlertid bekræftet med phenanthren. Anvendes teorien generelt for aromatiske hydrocarboner vil det betyde, forudsat at den mikrobielle nedbrydningskapacitet ikke er overskredet i forhold til hydrocarbonafgivelsen i opløst form fra den uopløste matrix, at væksten vil blive lineær og ikke eksponential, idet væksten da begrænses ifølge ligningen:

uopløst hydrocarbon $\Rightarrow$ opløst hydrocarbon $\Rightarrow$ celledannelse + stofskifteprodukter.

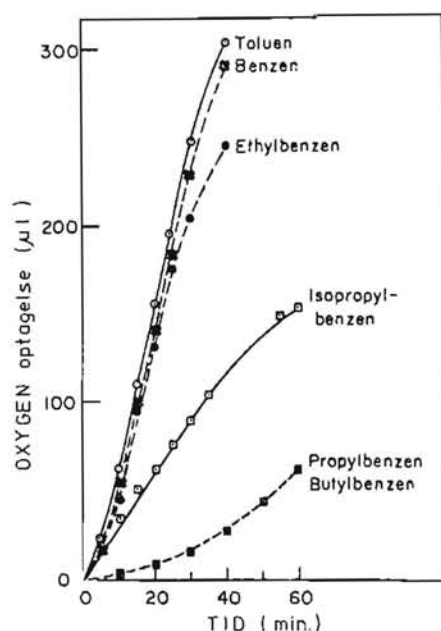
Hvis koncentration af opløst hydrocarbon omvendt ikke er vækstbegrænsende, vil der være mulighed for eksponentiel vækst med en vækstrate bestemt af bl.a. tilstedeværende nutritive muligheder med hensyn til N og P, iltforhold m.v.

I tabel 4 er angivet opløselighed af nogle aromatiske hydrocarboner /25/.

Benzen	1.860.000	µg/l
Toluen	500.000	"
Ethylbenzen	175.000	"
n- propylbenzen	120.000	"
Naphtalin	12.500	"
Phenanthren	1.600	"
Antracen	75	"
Benzantracen	10	"
1,2,5,6 Dibenzantracen	0,6	"

Tabel 4: Opløselighed for nogle aromatiske hydrocarboner.

Figur 2 viser opløselighedens betydning for den mikrobielle nedbrydning med hensyn til 5 aromatiske forbindelser.



Figur 2 /25/: Oxidation af aromatiske forbindelser af *Pseudomonas putida*.

Der synes at foreligge dokumentation for mikrobiel nedbrydelighed af aromatiske stoffer med molekylstørrelser spændende fra benzen til benzpyren. Hvorvidt aromatiske forbindelser med større molekyler end benzpyren kan nedbrydes af bakterier eller svampe vides ikke.

Opløseligheden i saltvand er mindre end opløseligheden i destilleret vand, se tabel 5.

	Opløselighed destil. vand	Opløselighed saltvand
Dodecan (C_{12})	3,7 ppb	2,9 ppb
Tetradecan (C_{14})	2,2 ppb	1,5 ppb
Hexadecan (C_{18})	0,9 ppb	0,4 ppb
Octadecan (C_{18})	2,1 ppb	0,8 ppb
Hexacosan (C_{26})	1,7 ppb	0,1 ppb

Tabel 5: Opløselighed i destilleret vand og saltvand for nogle hydrocarboner.

Opløselighed af n-alkaner aftager med længden af den alifatiske kæde og nedbrydeligheden afspejler dette forhold. n-alkaner med $n < 10$ vil ofte være toksiske overfor bakterier og hindre vækst /26/. Årsagen angives at være partiel disorganisation af phosphorlipoider i cellemembranen.

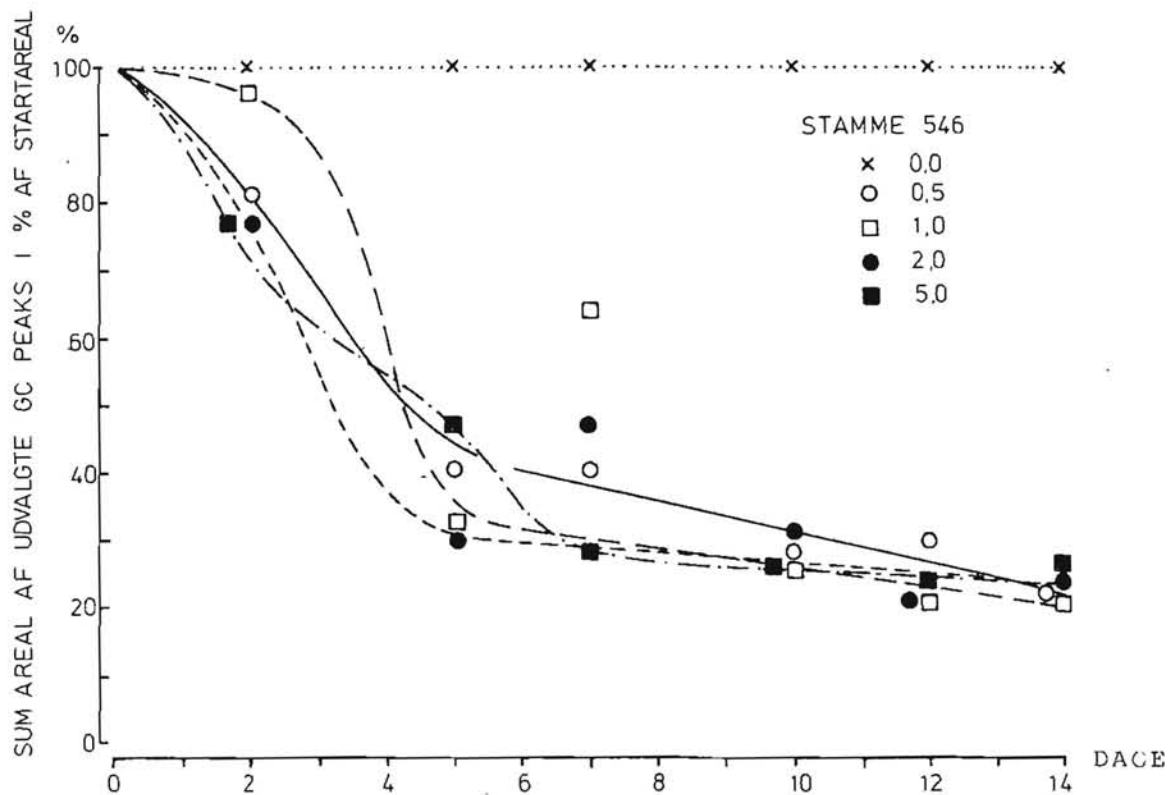
2.2.3 Egenskaber ved miljøet, som er af betydning for oliens nedbrydning.

Mikroorganismernes næringsbetingelser er afgørende for muligheder og hastigheder for olienedbrydning. Figur 3 viser betydning af NH_4NO_3 med hensyn til olienedbrydning. Koncentration af K_2HPO_4 er fixeret på 0,1 g/l og den anvendte oliemængde, 100 mg/100 ml (1 o/oo). Undersøgelsen er udført ved at tilsætte 10 ml havvand (bakteriedonor) til 90 ml syntetisk havvand.

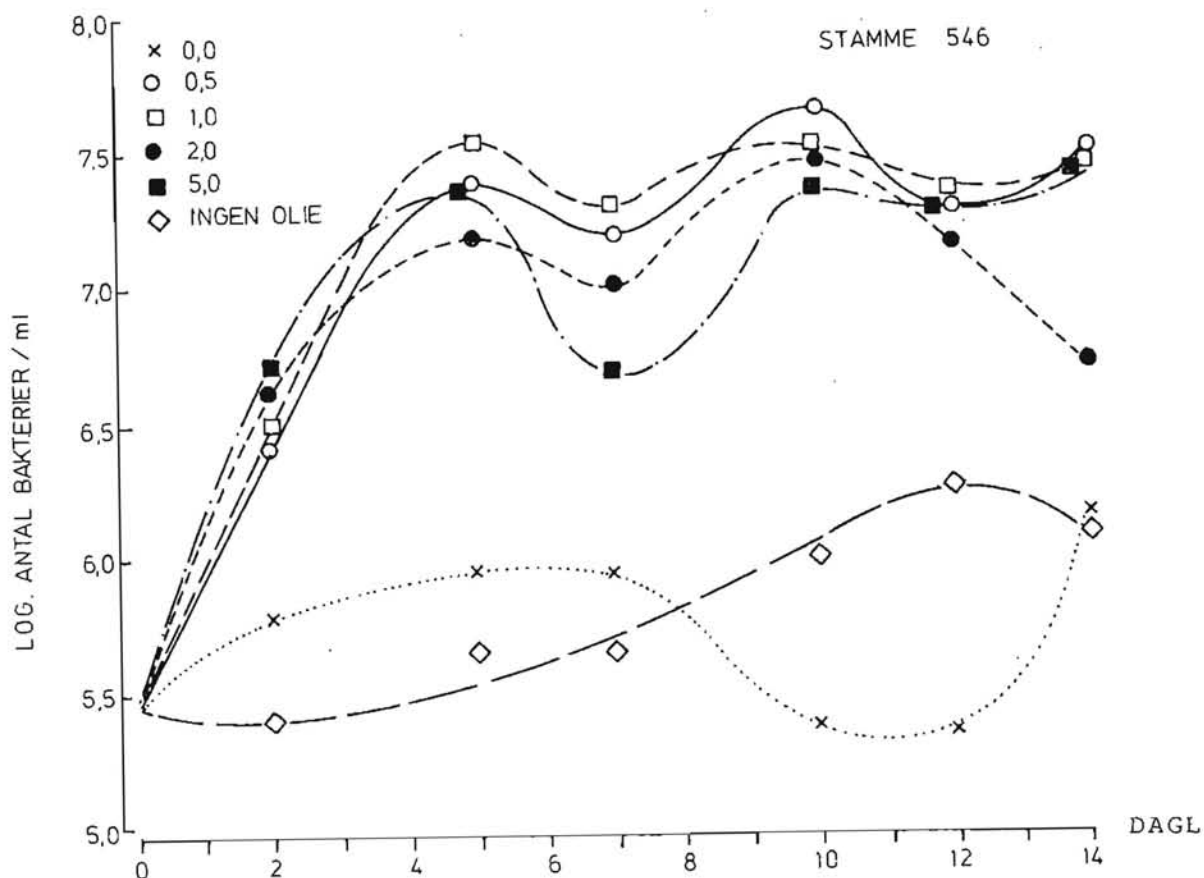
Figur 4 viser forøgelsen af bakterieantal i relation til indhold af NH_4NO_3 . Forsøg med phosphor antyder, at kvælstof i højere grad end phosphor kan blive en aktuel limitterende faktor for olienedbrydning i havvand /14/.

Selv om væksthastigheden ved lave temperaturer er relativt ringe og næringstilførslen parallelt hermed lettere opretholdes på et for vækst adekvat niveau, antyder Atlas og Barthas eksperimentelle undersøgelser, at kvælstof og phosphor også i arktiske egne kan blive en limitterende faktor /29/.

Anvendelse af oleofile "slow release fertilizers" er rekommenderet fra flere sider, fordi tilførte vandopløselige nitrater og phosphater under praktiske forhold hurtigt fjernes fra det område, hvor de tilsigtes at virke. Anvendelse af olieopløselige N-P-kilder vil sikre, at disse fertilizers forbliver netop, hvor de skal optimere den mikrobiologiske vækst (olie-vand-interfacen). Eksperimentelle undersøgelser viser, at biologisk nedbrydning målt efter 21 dage havde ført til 63% nedbrydning ved anvendelse af



Figur 3. Nedbrydning af olie ved forskellige kvælstofmængder i g/l ved 10°C. /14/. Sum af areal af selekterede spidser af G.C.-profiler udtrykt i % af samme areal i ikke mikrobielt nedbrudt olie.



Figur 4. Bakteriudvikling ved nedbrydning af olie ved forskellige kvælstofmængder i g/l ved 10°C. /14/.

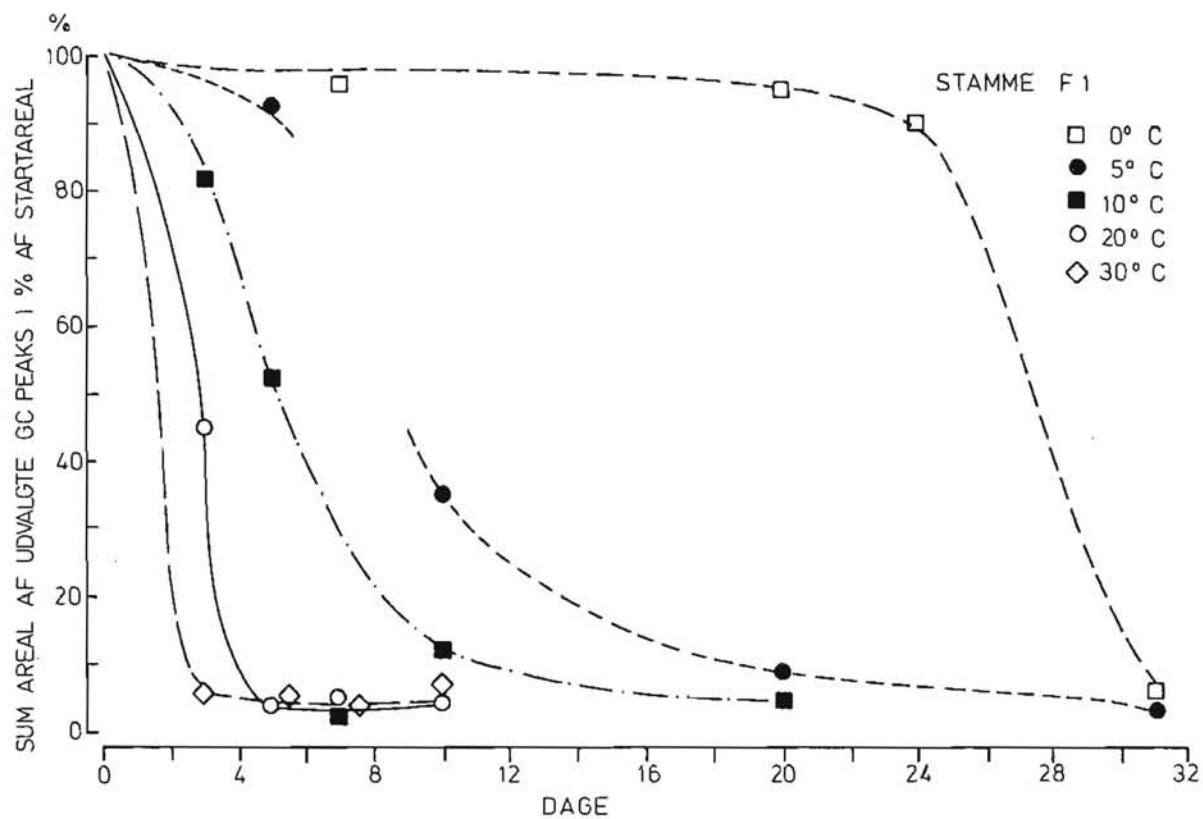
"slow-release-fertilizer" mod 40% i kontrolundersøgelser /27/. Mens nitrat og fosfat har vist effekt ved laboratorieforsøg i batchkulturer med hensyn til olienedbrydning, er det ikke, som anført ovenfor, sikkert at in situ forsøg vil vise det samme. Formentlig fjernes vandopløseligt nitrat og fosfat hurtigt fra olie-vand interfacen, og vil herefter ikke have muligheder for at influere på nedbrydningsprocessen.

Antal og art af tilstedeværende mikroorganismer er afgørende for den mikrobielle nedbrydning, idet de bestemmer dels længden af initiale lag-fase før olienedbrydningen tager fart, dels co-oxidationsmuligheder og det samlede enzymatiske udbud, der er til rådighed for oliens nedbrydning.

Temperatures betydning for omsætning af olie er genstand for betydelig interesse, specielt ved oliespild i arktiske områder. Figur 5a og 5b viser temperatures betydning for hastighed af olienedbrydning i monokultur-forsøg med to forskellige bakteriearter.

Det bemærkes af figur 5a og 5b, at lag-fase er bestemt dels af temperatur og dels af bakterieart. Optimal temperatur for olienedbrydning er afhængig af bakteriearter (figur 5a og 5b). Det fremgår af figur 5a og 5b, at bakteriel nedbrydning også finder sted ved 0°C. Nedbrydning af olie ved -1°C er endvidere eftervist ved undersøgelser i Alaska /28/.

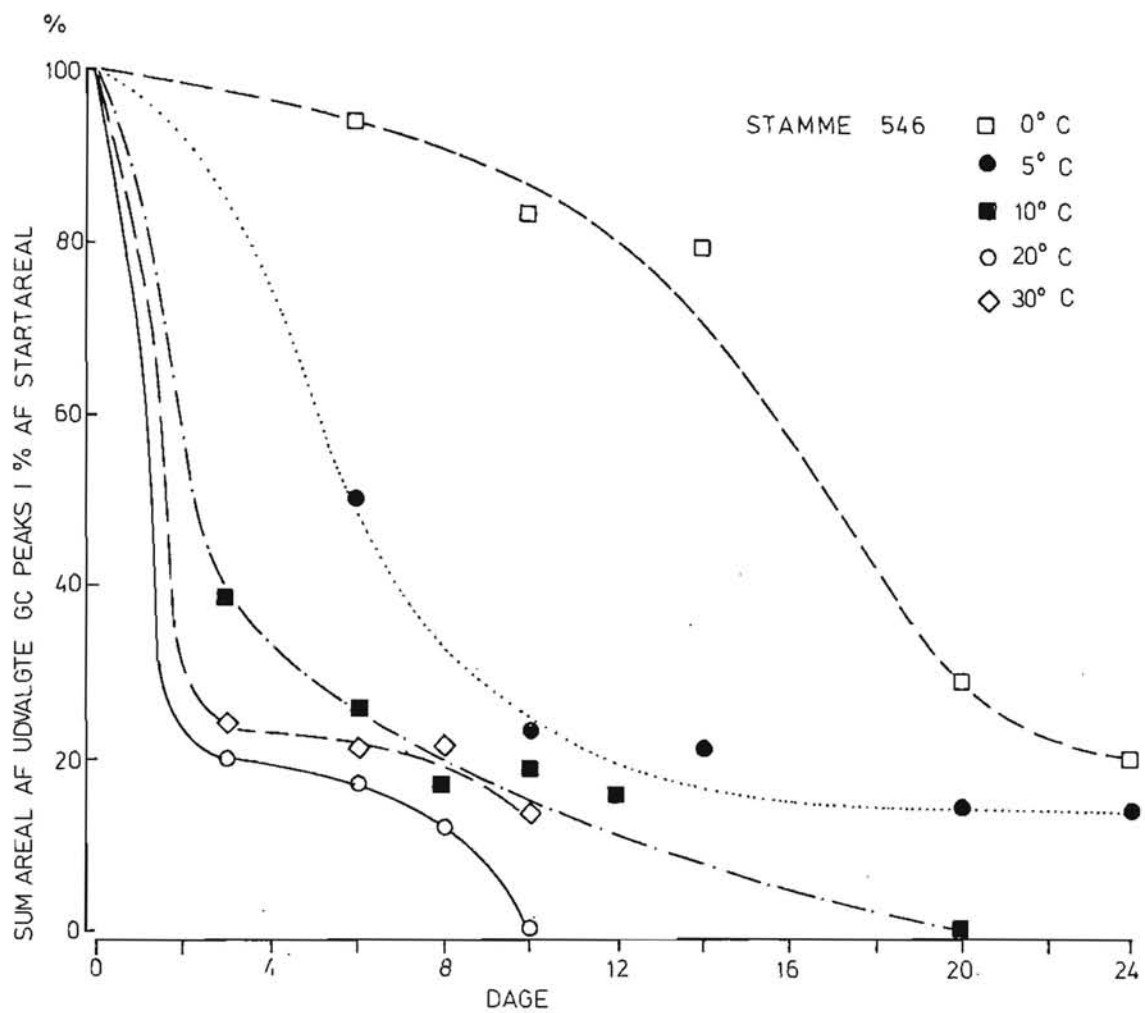
Undersøgelser i Alaska med mikrobielle donorer hentet fra jord, sediment, fersk- og saltvand podet i flydende medier med olie som eneste kulstofkilde er gengivet i tabel 6.



Figur 5a.

Nedbrydning af olie af bakteriestamme ved forskellige temperaturer. /14/.

Forklaring se figur 3.



Figur 5b

Nedbrydning af olie af bakteriestamme ved forskellige temperaturer /14/.

Forklaring se figur 3.

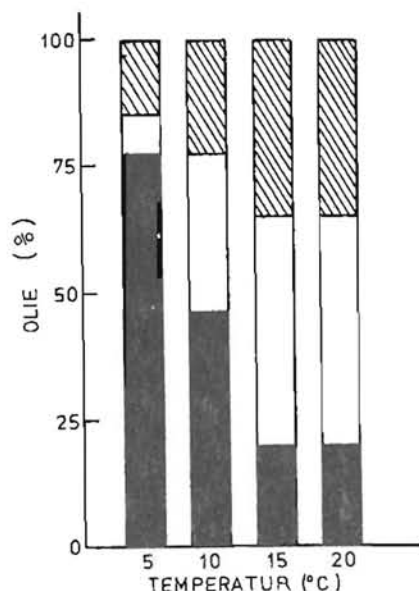
PRØVE	Beskrivelse af inocula	7 dage		14 dage		28 dage	
		4 C	8 C	4 C	8 C	4 C	8 C
1.	Olievædet jord	0	0	+	++	+++	++++
2.	Sediment fra flod	0	+	0	0	+	++++
3.	Olieprøve	0	+	+	++	+++	++++
4.	Olieforurennet sedimentprøve (sø)	0	+	+	++	+++	++++
5.	Jordprøve	0	0	+	++++	+++	++++
6.	Olieforurennet havvandsprøve	0	0	0	0	+	++
7.	Jordprøve	0	0	++	+++	+++	++++
8.	Brakvandsprøve	0	0	0	+	+	++++
11.	Ferskvandsprøve	0	0	0	0	0	+
13.	Jordprøve (tundra)	0	+	0	++	++	+++
14.	Olieforurennet jordprøve (tundra)	0	0	0	0	+	+++
15.	Jordprøve nær olieboring	0	0	0	0	+	++
16.	Olieforurennet jordprøve (tundra)	0	0	+	+	++	+++

Tabel 6 /28/ Relativ angivelse (visuel inspektion) af mikrobiel aktivitet i mineral-salt-oliemedium efter forskellige inkubationstider ved 4°C og 8°C.

Det fremgår af tabel 6, at visuel oxidation af olie ikke kan registreres før efter 14 dage ved 4°C, hvorimod nedbrydning ved 8°C i mange tilfælde kan registreres efter 7 dage.

Amerikanske undersøgelser viser, at det er forskellige bakterier, der dominerer ved opformering i oliemedier ved 0°C, 5°C og 10°C. Ved 0°C og 5°C dominerer *Pseudomonas* og *Vibrio*, mens opformering ved 10°C også giver muligheder for *Acinetobacter*, *Corynebakterier* og *Aeromonas* /3/. Temperaturen vil således influere ikke blot på de enzymatiske reaktioners hastighed, men også på biooxydationen af olie ved at være medbestemmende ved udselekteringen af den aktive mikroflora.

Figur 6 viser temperaturens betydning for fordampningen og den biologiske nedbrydning af olie.



Figur 6. Fordampningstab og biologisk nedbrydning ved forskellige temperaturer. Skraveret = fordampning, sort = residualolie og resten = biologisk nedbrudt olie. /29/.

Da netop den flygtige del af olien kan virke inhibitivt på bakterier, kan dette forklare den lange lag-fase ved nedbrydning ved lave temperaturer. Lag-fasen kan reduceres, hvis man som olie-substrat anvender "weathered" olie og ikke frisk olie /29/.

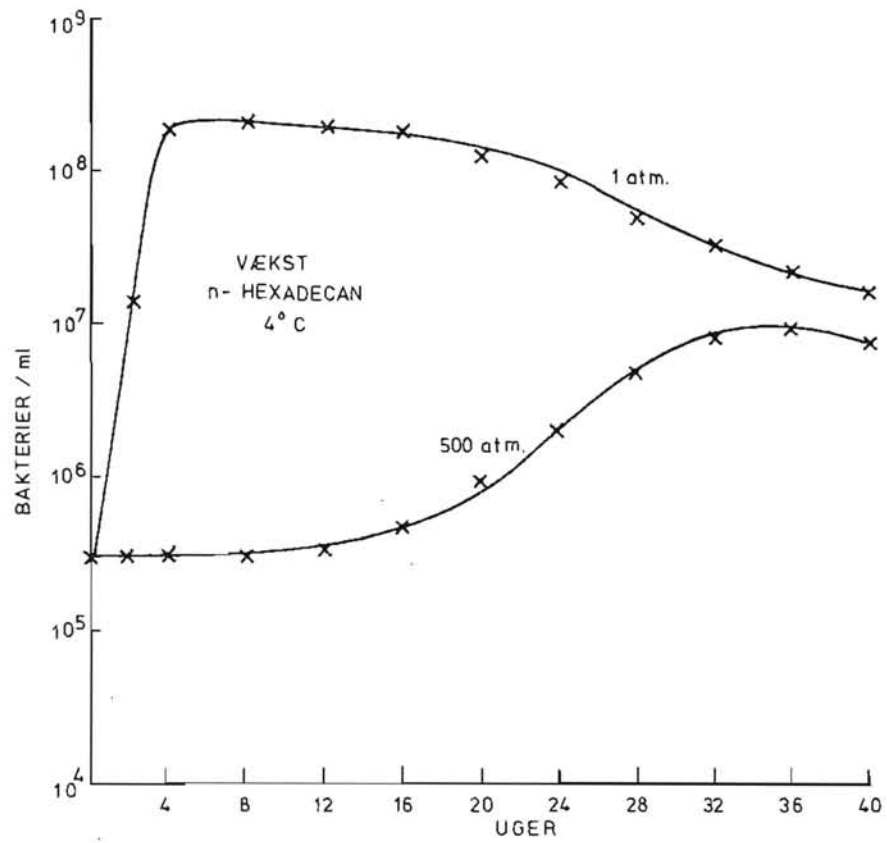
Temperaturens betydning for nedbrydningen af olie ved henholdsvis 2°C, 18°C og 30°C er kvantitativt angivet til henholdsvis 30%, 40% og 50% nedbrydning efter 2 uger /6/.

Spørgsmålet om nedbrydningsmuligheder af olie under anaerobe forhold kan i sidste instans blive afgørende, idet specielt resistente og uopløselige oliefraktioner kan havne i sedimenter, hvor der på visse lokaliteter er anaerobe forhold. Under iltfri forhold kan nitrat og sulfat optræde som brintacceptor/elektronacceptor. Kun 2 organismer vides at have evnen til at anvende sulfat som endelig elektronreceptor ved anaerob respiration, nemlig de obligat anaerobe bakterier *Desulfovibrio* og *Clostridium nigrificans*. *Desulfovibrio* angives almindeligt forekommende, og det påregnes, at disse bakterier

under udnyttelse af dehydrogenasesystemer kan udnytte og oxidere hydrocarboner under dannelse af H_2S . Clostridium nigrificans' krav om høje temperaturer gør den uinteressant i en arktisk sammenhæng.

Mens nedbrydning af olie under anaerobe forhold er erkendt som noget der kan finde sted, og som der er mikrobiel dækning for, er det alligevel generelt accepteret, at en sådan anaerob nedbrydning ikke spiller nogen væsentlig rolle i praksis. /10/. Denne erkendelse må indebære en accept af, at anaerobe bundsedimenter ikke er et ønskværdigt miljø for biologisk nedbrydning af olie. Amerikanske studier over et aktuelt oliespild viser, at der 8 måneder efter et oliespild ikke i sedimentet kunne registreres væsentlige kemiske ændringer i olien /30/. I vandfasen i åbne havområder vil iltindhold ikke være en limiterende faktor for olienedbrydningen.

Kendskab til olienedbrydning i dybe havområdet er ringe. Amerikanske undersøgelser viser, at ved de herskende temperaturer (oftest $< 5^{\circ}C$) og tryk (ca. 300-400 atm) er bakteriers vækst stærkt påvirket og olienedbrydning langsom. Figur 7 viser bakteriel udvikling ved henholdsvis 1 atm. og 500 atm. i et n-hexadecansubstrat.



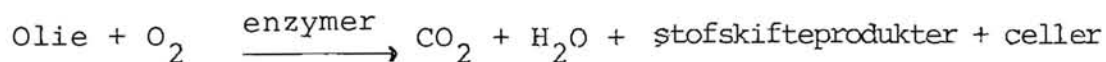
Figur 7 .

Vækst ved 4°C af blandingskultur af bakterier på n-hexadecan ved 1 atm. og 500 atm. /31/.

Tilstedeværelse af organisk stof vil normalt fremme olienedbrydning ved at sikre en rimelig høj initial mikrobiel biomasse, og ved at sikre et CO_2 -indhold, som er af betydning i den initiale fase af oliens nedbrydning. Omvendt kan større mængder organisk stof betyde en ilttømmning i området, som kan vanskeliggøre olienedbrydning /6/. Lee & Ryan viser, at olienedbrydningen forløber betydeligt hurtigere i estuarier end i havområder. Såvel den nutritive situation som initiale bakteriekoncentration vil betinge disse forhold /32/.

2.2.4 Principper i den mikrobiologiske nedbrydning af olie

Den mikrobiologiske nedbrydning af olie er kun en del, omend den væsentligste, af den totale biologiske nedbrydning, hvor også fisk, krebsdyr m.fl. medvirker. Principielt kan den mikrobielle olienedbrydning simplificeres til følgende:



Vandopløselige stofskifteprodukter vil hurtigt fjernes fra området via udvaskning og nedbrydning.

Alifatiske hydrocarboner nedbrydes ved β -oxidation eller ω -oxidation resulterende i CO_2 , H_2O , alkoholer, ketoner, aldehyder og syredannelse.

Cycloalkaners mikrobielle nedbrydning er lidet kendt.

Aromatiske hydrocarboner konverteres over diolforbindelser til formentlig catechol, hvorefter der sker en ringspaltning og videre nedbrydning.

Højerestående dyr og mikroorganismer synes forskellige i deres måde at oxidere aromatiske forbindelser på. Generelt er de initiale reaktioner med hensyn til den mikrobielle oxidation af aromatiske hydrocarboner ikke kendt tilbunds, men "mixed function oxidases" (M.F.O) påregnes at spille en afgørende rolle ved hydroxylering af den aromatiske ring og dannelse af diol-forbindelser /16/.

M.F.O. omfatter aryl-hydrocarbon-hydroxylase (A.H.H.), som er af betydning ved metabolisk omsætning af olie. A.H.H. er fundet

i fisk, krebsdyr, søstjerne, søpindsvin, havbørsteorm og visse mikroorganismer, men tilsyneladende ikke i skaldyr og alger /34/. M.F.O. eller oxigenaser angives at kunne starte de initiale reaktioner ved ganske lave iltkoncentrationer. Produktionen af disse enzymer er genetisk betinget og knyttet til ekstrakromasomale faktorer (plasmider). Evnen til at opretholde denne evne til enzymproduktion synes let at gå tabt i laboratoriet. Forekomst af A.H.H. i fisk, krebsdyr, søstjerner, havbørsteorm og søpindsvin viser:

- at andre enzymer end de mikrobielt producerede deltager i oliens biologiske oxidation, og at en clearance af olieforurenede konsumemner (fisk, krebsdyr) kan påregnes, takket være f.eks. A.H.H.
- at monitororganismer (indikatororganismer) for olieforurening bør søges blandt skaldyr som ikke besidder A.H.H., og som akkumulerer forureningsstoffer i sit væv.

Muligheder for en extracellulær nedbrydning af olie opnås ved udskillelse af extracellulære enzymer eller ved frigivelse af enzymatisk materiale fra døde mikroorganismer. Manglende overensstemmelse mellem registreret celletal og registreret nedbrydning kan eventuelt forklares via teorien om extracellulær nedbrydning. Frigivne enzymer er vist at bevare aktiviteten efter frigivelsen fra det cellulære miljø, og sådanne enzymer angives af betydning ved olienedbrydning i dybhavsområder med langsom vækst af mikroorganismer /33/. Extracellulære produktioner af bakterier og gærceller angives af betydning for emulsionsdannelsen.

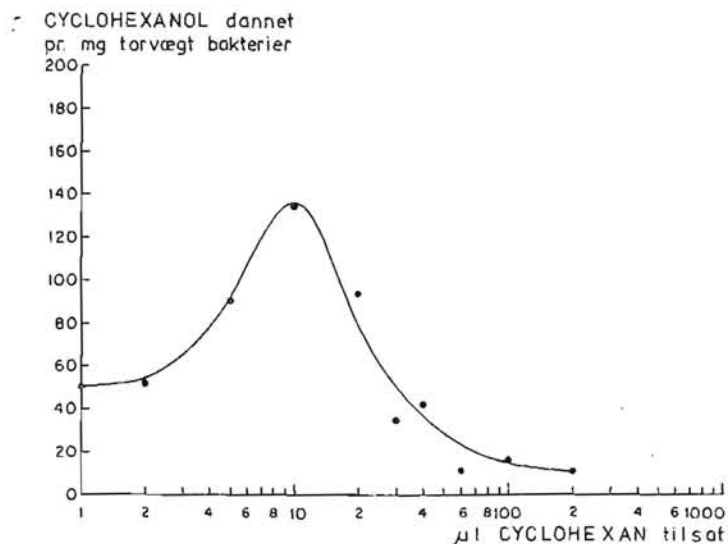
Co-oxidation (co-metabolisme) er et fænomen af stor betydning ved nedbrydning af hydrocarboner. Co-oxidation er oprindeligt defineret som en inkomplet oxidation af et stof parallelt med at mikroorganismen udnytter et andet stof som energi-kulstofkilde.

Komplet biooxidation af cycloalkaner er eftervist i et system indeholdende to forskellige pseudomonasarter, n-alkaner og

cyclohexan. Ingen af de to bakterier kunne alene udnytte cyclohexan mens samarbejdet resulterede i en komplet nedbrydning. Første trin i denne nedbrydning var en konvertering af cyclohexan til cyclohexanol via co-oxidation med sekundær udnyttelse af det producerede cyclohexanol af den anden pseudomonasstamme. Kontrolforsøg viste følgende /35/:

- at den alkanoxiderende bakterie ikke alene kunne nedbryde den ved co-oxidation producerede cyclohexanol
- at den cyclohexanol-udnyttende bakterie udnyttede cyclohexanol via en komplet nedbrydning (CO_2 , H_2O , celler).
- at den cyclohexanol-udnyttende bakterie ikke kunne nedbryde cyclohexan, men kun cyclohexanol.

Co-oxidation er herefter vist at være en afgørende forudsætning for cyclohexans nedbrydning. Omvendt synes der endnu ikke fundet bakterier som alene kan udnytte cyclohexan som eneste energikilde. /21/. Flere determinanter kontrollerer den hastighed hvormed cyclohexanol dannes. Af figur 8 fremgår det, at ved konstant mængde af n-alkan, vil produktionen af cyclohexanol være bestemt af koncentrationen af cyclohexan. Kurven i figur 8 forklarer, at cyclohexanoldannelsen stiger med stigende koncentration af cyclohexan, indtil de toksiske virkninger af cyclohexan dikterer et fald af produceret cyclohexanol.



Figur 8

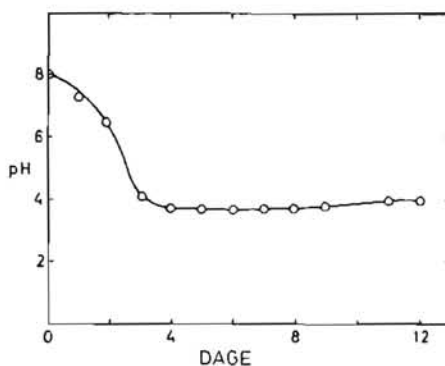
Cyclohexanoldannelse som funktion af cyclohexankoncentrationer. /35/.

Netop fordi cycloalkaner kan udgøre mere end 50% i nogle olier, og fordi cyclohexan er karakteristisk for denne fraktion, er nedbrydningsmuligheder og nedbrydningsprincipper væsentlige for denne hydrocarbon, som repræsenterer oliens mere vanskeligt nedbrydelige fraktion.

2.2.5 Komplet-inkomplet nedbrydning af olien.

Afgørende med hensyn til de biologiske konsekvenser vedrørende oliens nedbrydning er, at denne nedbrydning ikke synes 100%, i det mindste ikke under laboratoriemæssige betingelser. Forskellige angivelser må tages med forbehold, da de ofte refererer til forskellige temperaturer, forskellige tider og forskellige bakteriedonorer. I litteraturen findes angivelser fra 26,5 - 97,2% mikrobiologisk nedbrydning af olie under forskellige laboratoriebetingelser ved 25°C efter 30 dages forløb /10/. Atlas /20/ angiver, at 40-80% af råolie nedbrydes via mikrobiel aktivitet. Slutninger fra laboratoriemæssige batch-forsøg med hensyn til olienedbrydning og til naturlige forhold kan imidlertid kun drages med forsigtighed /32/. Batch-kulturer er underkastet visse begrænsninger i den mikrobielle aktivitet som /36/:

- udtømning af essentielle næringsstoffer
- manglende muligheder for co-oxidation
- inhibitiv effekt af syrer, som ophobes i batch-kulturen, blandt andet ved at nedsætte pH (se figur 9)
- anvendelse af monokulturer eller i det mindste smalspektrede inocula med hensyn til arter og oftest enten alene bakteriekulturer eller alene gærcele/svampekulturer.



Figur 9 : Variation i pH under mikrobiel nedbrydning af ekofiskolie af gærceller (*Saccharomycopsis lipolytica*). /7/.

Graden af nedbrydning synes endvidere bestemt af hvilke mikroorganismer der deltager i nedbrydningen. Naturlige forhold vil oftest byde på muligheder for at mobilisere såvel bakterier som gærceller og svampe i biooxidation af olie. Bakterier er i forsøg angivet at kunne udnytte 35% - 70% af paraffiner i råolie mod 85% - 92% nedbrydelighed af svampe. Kombinationer af bakterier, gærceller og svampe angives at kunne præstere langt større nedbrydning end disse mikroorganismer kan enkeltvis /37/. Denne kendsgerning påpeges med rette at måtte medtages i diskussioner om nedbrydning af olie i naturen, hvor bakterier angives at initiere nedbrydningen med angrebepunkt i alkaner og eventuelle cycloalkaner med en succesiv udvikling i retning af større aktivitet af gærceller og svampe og hertil knyttet nedbrydning af cyclohexaner og aromatiske forbindelser.

I naturen vil problemstillingen være at nedbryde blandingsfraktioner af olie ved hjælp af den til rådighed værende blandingskultur. Dette sker uden at stofskifteprodukter får reel mulighed for at influere på bakteriernes/gærcellers eller svampes aktivitet. Denne problemstilling er en anden end den der er knyttet til laboratoriemæssige batch-forsøg. Hvorvidt disse aktiviteter efterlader en residualrest af olie, og hvorvidt en eventuel residualrest kan nedbrydes biologisk af højere organismer synes stadig uafklaret. Tar balls repræsenterer en form for residualolie som opfattes som et resultat af fysiske, kemiske og biologiske ændringer af den oprindelige olie. Nyere iagttagelser antyder en hurtigere halveringstid end tidligere antaget med hensyn til tar balls (1 - 4 måneder) /38/. Colwell har tidligere beskrevet mulighed for mikrobiel dannelse af langkædede n-alkaner som optræder i tar balls, og antyder mulighed for at tar balls må opfattes som mikrobielle nydannelser i forbindelse med mekanisk påvirkning /39, 40/.

2.3 BESTEMMELSE AF OLIENEDBRYDENDE MIKROORGANISMER

2.3.1 Indledning

Mikroorganismer, som er omtalt i forbindelse med nedbrydning af olie omfatter bakterier, gærceller, svampe og i det mindste en enkelt algeart (*Prototheca zopfii*). Disse organismers evner til nedbrydning af såvel alkaner som aromatiske hydrocarboner er eftervist /41/. Hidtidige forsøg på estimering af antal og art af olienedbrydende mikroorganismer er begrænset til bakterier, gærceller og svampe. I det følgende omtales metoder til bestemmelser af disse olienedbrydende mikroorganismer. Sådanne bestemmelser rummer såvel et kvantitativt som et kvalitativt aspekt. Kvantitative undersøgelser af referenceområder og forurenede områder vil afsløre en lokalitets praktiske muligheder for, under de givne fysisk-kemisk-biologiske forhold at mobilisere et mikrobielt-enzymatisk respons på olieforurening. Dette respons er omvendt den basale forudsætning for oliens omsætning og fjernelse, bortset fra kosmetiske pseudofaktorer (sedimentering, fordampning). En kvalitativ bestemmelse af, hvilke bakterier, svampe og gærceller, der udvikles på en given lokalitet som svar på olieforurening, er aktuelt for at kunne vurdere hvorvidt skaldyr - krebsdyr - fiske- eller humanpatogene mikroorganismer udvikles i relation til oliespild. Kvantitative bakteriologiske undersøgelser til afsløring af relationer mellem olienedbrydende kim og totalkim angives at være en fintmærkende indikator på olieforurening, idet dette forhold beholder sin indikatorværdi efter selve olien er forsvundet /13/.

2.3.2 Kvantitative bestemmelser af olienedbrydende mikroorganismer

Principielt foreligger to metoder til en kvantitativ bestemmelse, nemlig tælling af mikroorganismer på faste medier med olie som eneste kulstofkilde eller tælling af mikroorganismer efter "most probable number" metode (MPN) med olie som eneste kulstofkilde i flydende substrater.

En reel standardisering af metoder og substrater i relation til registrering af olienedbrydende mikroorganismer mangler totalt. Foreliggende resultater er følgelig ikke altid sammenlignelige. Såvel med hensyn til faste medier som MPN-medier er flere forskellige substrater under anvendelse. Principielt kan alle MPN-substrater konverteres til faste medier ved at tilsætte størkningsmiddel (agar, silicagel). Nogle substrater finder anvendelse både i faste og flydende medier, som f. eks. det kommercielt tilgængelige Bushnell-Haas-substrat.

Faste medier

Faste medier til tælling af olienedbrydende bakterier omfatter:

- 1) Agarmedier indeholdende diverse salte, herunder nitrater eller ammoniumsalte og med incorporeret hydrocarbon som eneste kulstofkilde. Størkning af mediet opnås ved anvendelse af agar i koncentration 1,5%.
- 2) Silicagelmedium indeholdende forskellige salte, herunder nitrater og med incorporeret olie. Størkning af mediet opnås ved tilsætning af silicagel i koncentrationen 5%.

Begge faste medier kan indrettes specielt til bakterie- eller svampe/gærcelletællinger via tilsætning af henholdsvis antibakteriemidler (antibiotica) eller antisvampemidler (fungicider). Skal plader anvendes til specifik bakteriefælling tilsættes fungizone, som hindrer svampevækst uden at skade bakterier. Skal plader anvendes til svampe/gærcelletællinger tilsættes tetracyclin og streptomycin og pH justeres til 4.5

Nye undersøgelser af Colwell, USA, synes at vise, at agar-medier ikke er egnede til tælling af olienedbrydende mikroorganismer. Colwell angiver at vækst på agarmedier indeholdende olie ikke nødvendigvis bør tilskrives olien, men kan skyldes mikrobiel udnyttelse af selve agaren eller urenheder i agaren. Muligheden for at udnytte agar som kulstofkilde kompromitterer agarmediers anvendelighed /5/. Netop i det marine miljø omsættes naturligt enorme agarmængder (agar indgår i alger) og evnen til

at nedbryde polysakkaridet agar kan ikke forventes at være en eksklusiv egenskab hos bakterier i havvand. Antallet af agarnedbrydere kan være lige så stort som antallet af olienedbrydere /45/. Parallel anvendelse af agarplader med og uden olie sikrer en mulighed for at substrahere de agarudnyttende, men ikke olieudnyttende kim fra kimtallet på olieagarpladen.

Anvendelse af silicagelplader angives at give færre falske positive kolonier end agarplader /42/. Resultater opnået ved hjælp af silicagelplader korresponderer i komparative forsøg godt med resultater opnået ved MPN-metoder /42/. Når silicagelplader alligevel ikke har fået nogen større anvendelse, skyldes det ikke pladens manglende troværdighed, men tekniske problemer ved fremstilling af silicagelplader. Mens agarplader bekvemt fremstilles ved ophældning af ca. 45°C varmt flydende substrat, som størkner i pladerne ved lavere temperaturer, er størkning af silicagelsubstrat pH-dirigeret og vanskelig at styre. Momentan størkning før ophældning kan indtræde, og desuden er silicagelplader blødere i konsistens og sværere at tilså end agarplader.

Ved undersøgelse af store vandmængder kan membranfilterprincippet anvendes i forbindelse med faste medier. Ønskes eksempelvis 100 ml vand undersøgt for indhold af olienedbrydere filtreres 100 ml af det pågældende vand gennem membranfilter (porestørrelse 0,45 µm). To filtre hver repræsenterende 100 ml af samme vandprøve placeres på medium med og uden olietilsætning for at kompensere for bakterier, der udnytter agar (Flavobakterier, Pseudomonas, Agarbakterier, Cytophaga m.fl.).

Anvendte dyrkningstemperatur varierer fra 5°C - 37°C. Dyrkningstemperaturen bør principielt afspejle de klimatiske forhold, der råder hvor prøverne indsamles. Ved prøver fra arktiske områder vil man således oftest foretrække så lave temperaturer som 15°C. Dyrkningstiden er blandt andet bestemt af den anvendte temperatur. Dyrkningstider < 15 dage bør frarådes. Ved dyrkningstemperatur på f.eks. 5°C må dyrkningstiden forlænges til mindst 4 uger /11/.

M.P.N.-metoder

MPN-metoder synes i stigende grad at foretrækkes ved bestemmelser af antal olienedbrydende mikroorganismer /14, 16/. Sådanne metoder kan på samme måde som faste medier gøres selektive for bakterier eller gærceller/svampe. Såvel hvad angår faste substrater som flydende substrater resterer et nødvendigt arbejde med hensyn til at standardisere metoderne, f.eks. med hensyn til:

- Substratsammensætning
- Inkubationstid
- Inkubationstemperatur
- Mængde af tilsat olie (oftest 0.1 - 1%)
- Buffersammensætning
- Aflæsning

Med hensyn til MPN-substrater synes i det mindste 3 forskellige substrater i brug p.t.

- 1) Bushnell/Haas-substrat (kommercielt tilgængeligt)
- 2) Bunch substrat
- 3) Colwell substrat

Der er i alle 3 tilfælde tale om emitteret "havvandsmedium". Colwell eksperimenterede med flere substrater og fandt, at substratets sammensætning specielt vedrørende bufferkapacitet til hindring af pH-fald via syreproduktion var vigtig /15/. Colwell angiver, at koncentration af olie i substratet er af betydning, og angiver en minimumkoncentration på 0,1% og optimal koncentration mellem 0,5 - 1% /15/.

Dyrkningstid er blandt andet bestemt af dyrkningstemperatur og skal være mindst 6 uger ved 5°C /19/.

MPN-undersøgelser kan foretages med 3 eller 5 rør i hver række (~ 3 eller 5 rør repræsenterende samme fortynding). 5 rør giver mindre spredning på tallene, men 3 rør foretrækkes oftest af arbejdshensyn.

Bestemmelse af hvorvidt et udvalgt rør i MPN-opstillingen er positiv med hensyn til vækst vil oftest ikke give anledning til problemer.

Som positive rør opfattes:

- rør med total turbiditet
- rør med turbiditet øverst i røret
- rør med klar ændring af olien eller fjernelse af olien (trådede, slimede dannelser øverst i røret).

Proteinproduktion i røret som udtryk for bakteriel opformering er udnyttet af Colwell til udpegning af positive rør. Colwell har vist, at der er god overensstemmelse mellem proteinproduktion og hydrocarbontab (se tabel 7).

Hydrocarbon- koncentration (%)	Protein- produktion (µg/ml)	Hydrocarbon- tab (mg)
0	14	0
0.05	22	18.7
0.10	31	58.5
1.0	210	415

Tabel 7 : Relation mellem hydrocarbontab i substrat og proteinproduktion. /15/.

Tabel 8 viser komparative undersøgelser vedrørende substratets og metodens betydning for det registrerede antal af olienedbrydende mikroorganismer.

Inoculum	Medium			
	MPN	Basalagar	OA no. 2	SGO
Colgate Creek sediment	9.2×10^2	6.4×10^5	4.2×10^5	6.0×10^2
Colgate Creek vand	1.6×10^2	4.4×10^5	2.0×10^5	9.0×10^1
Eastern Bay sediment	8.0×10^0	9.0×10^5	2.0×10^4	1.0×10^1
Eastern Bay vand	0.5×10^0	6.0×10^3	9.0×10^2	1.0×10^2

Tabel 8 : Tællinger af olienedbrydende mikroorganismer under anvendelse af forskellige metoder. /42/.
Tællinger angiver antal pr. ml vand eller g sediment.

MPN = tælling efter MPN-metode (Colwell substrat)

Basal agar 2 agar anvendt ved bestemmelse af total kimtal

OA no. 2 = Olieagar til specifik tælling af olienedbrydere

S.G.O = Silicagel - olie - substrat til specifik tælling af olienedbrydere.

Det fremgår af tabel 3, at tællinger på OA no. 2 afviger betydeligt fra S.G.O og MPN-metoden.

Tabel 8 mere end antyder, at standardiseringsbestræbelser med hensyn til metodik ved kvantitative bestemmelser af olienedbrydere er nødvendig, og at resultatet af sådanne undersøgelser i værste fald i højere grad bliver bestemt af anvendte metode end den mikrobiologiske situation.

På nærværende tidspunkt synes MPN at være at foretrække af følgende grunde:

- MPN er let at arbejde med
- MPN-rør med skruelåg sikrer mod kompromitterende dehydrering ved de lange dyrkningstider.
- MPN synes at give færrest falske positive, d.v.s. giver ikke for høje tal
- MPN sikrer bedste spiringsbetingelser for olienedbrydende mikroorganismer.

2.3.3. Kvalitative bestemmelser af olienedbrydende mikroorganismer.

Kvalitative bestemmelser af olienedbrydende bakterier har i løbet af de sidste 10 år ført til et større kendskab til hvilke bakterier, der er i stand til at nedbryde alkaner, ringformige forbindelser og phenoler som findes i råolier. En lang række ringformige, organiske miljøforurenende stoffer, herunder polycykliske aromater, inducerer enzymproduktion (aryl-hydrocarbonhydroxylase) i højere organismers leverceller og hos visse bakterier.

Kvalitativ bestemmelse af bakterier, der producerer enzymer som nedbryder miljøgifte har informativ værdi, fordi de hæfter den olienedbrydende egenskab på bestemte og kendte bakteriearter/gærcele-svampearter, hvis kendte: temperaturkrav, iltkrav, saltresistens og næringsstofkrav og forekomst i havvand og sedimenter giver muligheder for vurdering af aktuelle nedbrydningsmuligheder og muligheder for at optimere den mikrobielle nedbrydningsproces, f.eks. via tilsætning af fertilizers. Desuden giver de informationer med hensyn til hvorvidt olienedbrydning evt. er forlenet med simultan opformering af uønskede bakterier (skaldyr - krebsdyr - fiske- eller humanpatogene mikroorganismer).

3. METODER

3.1 INDSAMLING AF PRØVER

Indsamling af prøver blev foretaget fra GRØNLANDS FISKERIUNDER-SØGELSERS kutter TORNAQ i perioden 4-6. juli 1977. Vandprøverne blev udtaget i 1 m dybde med Knudsen-vandhenter, der blev steriliseret i kloramin før brug. Vandet blev overført til sterile $\frac{1}{2}$ liters glasflasker. Temperatur og saltholdighed blev målt i 1 m dybde.

Sedimentprøverne blev indsamlet med lysekrone-bundhenter, hvis plastikrør blev steriliseret med kloramin før brug. De to øverste lag af sedimentet fra hver af de 3 rør blev overført til en steril plasticbeholder. Det medfølgende vand blev efter 4 timers sedimentering hældt fra.

Både vand og sediment blev opbevaret ved temperaturer mellem 1° og 4°C under de 2 døgns transport til VKIs laboratorium i Hørsholm.

3.2 ANALYTISKE METODER

3.2.1 Indledning

I afsnit 2.3 er foretaget en generel gennemgang af metoder til kvantitativ påvisning af olienedbrydende mikroorganismer samt diskuteret fordele og ulemper ved disse metoder. I dette afsnit skal redegøres for den metodik, som danner grundlaget for de i afsnit 4 beskrevne resultater.

3.2.2 Tælling af totalkim på agarplader

Totalkim er bestemt på marin agar (Difco Bacto-marine agar 2216). Substratet er fremstillet efter formel oprindelig angivet af Zobell. Sammensætning fremgår af bilag 1.

Fremgangsmåde ved undersøgelse af sediment og vand er, at der fremstilles fortyndinger af undersøgelsesmaterialet, så der opnås fortyndinger fra 10^{-1} - 10^{-6} . Som fortyndingsvæske anvendes fysiologisk saltopløsning. Fra disse fortyndinger podes i petriskåle, og inocula repræsenterende de anvendte fortyndinger overhældes med smeltet til 45°C afkølet marinagar. Inkubationstiden er 7 dage ved 20°C .

3.2.3 Tælling af total antal gærceller/svampe på agarplader

Anvendte agarsubstrat er marin agar tilsat streptomycin ($50\mu\text{g/ml}$) og tetracyclin ($50\mu\text{g/ml}$). pH indstilles på 5.0. Inkubationstid er 7 dage ved 20°C .

3.2.4 Tælling af olienedbrydende bakterier på agarplader

Sammensætning af anvendte agarsubstrat fremgår af bilag 2. Substratet er Colwells MPN-substrat tilsat agar og med et reduceret indhold af $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ for at opnå forligelighed mellem $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og phosphater, idet autoklavering af substratet i sin oprindelige form medførte udfældninger. Som eneste kulstofkilde er anvendt 0,5% Shell Vitrea oil 27, en detergentfri olie med følgende sammensætning:

alkaner ca. 70%

cycloalkaner ca. 24%

aromatiske forbindelser ca. 6%

Oliens homogene inkorporering i det flydende substrat kræver en speciel teknik, som beskrevet af Baruah et al. /43/. Efter denne teknik adsorberes olien til silica (Cab-O-Sil), partikelstørrelse $12\mu\text{m}$). Adsorptionen til silica foregår ved at opløse 5 g olie i 15 ml ethylæter og blande det i en morter med 5 g silica. Æteren afdampes i rotationsinddamper og det indvundne lette pulver (olie adsorberet til silica) kan herefter fordeles homogent i substratet

ved forinden tilsætning at blande olie-silicapulveret op i lidt vand. Med hensyn til olie-agarplader anvendt til tælling af bakterier er pladerne tilsat fungizone (10 µg/ml) for at undertrykke svampe-gærcellevækst.

Parallelt med fremstilling og anvendelse af olieagarplader produceres og anvendes basisagarplader, d.v.s. "olieagarplader" uden olietilsætning, (jfr. afsnit 2.3). Pladerne tælles efter 14 dage ved 20°C og igen efter 28 dage ved 20°C.

3.2.5 Tælling af olienedbrydende gærceller og svampe på agarplader

Skal agarplader anvendes til tælling af gærceller og svampe, må bakteriel vækst på pladerne som nævnt undertrykkes. Agarsubstratet gøres selektivt for svampe-gærceller ved at tilsætte streptomycin (50µg/ml) og tetracyclin (50 µg/ml) og pH indstilles på 5.0. Iøvrigt foregår substratfremstilling og tælling nøjagtigt som ved tælling af bakterier på agarplader.

3.2.6 Tælling af olienedbrydende bakterier, svampe og gærceller på silicagelplader.

Der blev initialt foretaget forsøg med silicagelplader med henblik på senere praktisk anvendelse. Metoden bygger på en metodik angivet af Funk /44/. Tekniske vanskeligheder (se afsnit 2.3) i forbindelse med at flere forskere netop på undersøgelsestidspunktet ændrede metoder fra anvendelse af faste substrater til M.P.N.-metoder, medførte beslutning om at droppe silicagelsubstratet til fordel for MPN-metoden. Eftersom det ikke kan udelukkes, at silicagelsubstrat er et anvendeligt substrat ved undersøgelse af store vandmængder i uforurenede områder under samtidig anvendelse af membranfiltermetoden (se afsnit 2.3) skal fremstillingsprocessen for dette substrat medtages her (se bilag 3). Seki /45/ angiver, at antallet af agarudnyttende bakterier kan være større end antallet af olieudnyttende kim, hvorfor silicagelplader bør anvendes i stedet for agarplader.

Seki gør endvidere opmærksom på, at der ikke blot bør anvendes inert (uudnyttelig) størkningsmiddel (silicagel), men der bør også anvendes inerte filtre som glasfiltre i stedet for normalt anvendte celluloseholdige membranfiltre.

3.2.7 Tælling af olienedbrydende mikroorganismer ved MPN-metoder.

En komparativ undersøgelse til dokumentation for anvendelsesmuligheder af alle kendte MPN-substrater lå udenfor rammerne af dette projekt. Under henvisning til den betydelige uklarhed, der findes med hensyn til hvilke substrater, der bør bruges, blev der udvalgt to substrater, som i nyere undersøgelser har vist sig anvendelige og bedre end andre substrater. De to udvalgte MPN-substrater er beskrevet af Bunch-Harland /14/ og Colwell /15/. Vedrørende substraternes sammensætning se bilag 4 og 5. Substratet fordeles på plastik tubes med skruelåg med 5 ml substrat pr. tube. Olien tilsættes med mikropipette 50 μ l pr. tube svarende til 1% olie. Colwellsubstratet blev ændret med hensyn til indhold af $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ som omtalt under 3.2.3. Tilsåede plastik tubes henstod ved 15°C i 6 uger i rysteapparat, der er indstillet på 100 rystninger pr. minut. Hver fortynding blev i nærværende undersøgelse repræsenteret med 3 rør (triplicateopsætning). Rørene blev aflæst hver uge.

Nævnte substrater blev afprøvet overfor følgende olienedbrydende bakterier og svampe: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Grafium*, *Pentamyces*, *Candida*. Anvendte olieklilder i forsøget var paraffinolie og olie (Shell Vitrea oil 27). Svampe og bakterier viste oftest hurtigere vækst og større turbiditet i Colwell-substratet end i Bunch-Harland substratet. Efter nedsættelse af $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -indholdet synes således Colwell-substratet at være at foretrække. Colwell-substratet danner følgelig grundlag for resultater angivet i afsnit 4. Der er ikke ved tællingerne efter MPN-metoden forsøgt specialtællinger af henholdsvis bakterier og gærceller/svampe, fordi de to sidstnævnte ikke blev påvist på plademedier med anvendelse af selektive plader.

3.2.8 Kvalitative bestemmelser vedrørende isolerede olie-nedbrydende bakterier.

Bakteriestammer blev isoleret fra medier med olie som eneste kulstofkilde. Stammerne repræsenterer Færingehavn, Malenebugten og Kigdlut Iluat, og har repræsentanter fra såvel vandfase som sediment. Nogle stammer blev isoleret fra agarplader og andre fra MPN-substrater.

Biokemiske-taxonomiske undersøgelser er udført ved hjælp af følgende tests:

Hæmolyse, pigmentering, cytochromoxidase, katalase, tween 20, tween 80, gelatine O/F-test, Simmons citrat, bevægelighed (SIM), indol (S.I.M) H_2S (S.I.M), 1% tryptone uden salttilsætning, 1% tryptone med 4% NaCl, 1% tryptone med 7% NaCl, Vos Proskauer, arginin (Møller), lysin (Møller), urinstof, nitratreduktion, arabinose, cellobiose, laktose, sucrose, glycerol, stivelse, xylose, chitin, kødvandsbouillon med 1% NaCl ved 5° , kødvandsbouillon med 1% NaCl ved 10° , kødvandsbouillon med 1% NaCl ved $15^{\circ}C$, kødvandsbouillon med 1% NaCl ved $30^{\circ}C$. pteridin, gramfarvning.

Alle aflæsninger af reaktioner afsluttet senest 7. dagen med daglige aflæsninger af ændringer i reaktioner.

Anvendte dyrkningstemperaturer, hvor andet ikke er angivet $20^{\circ}C$.

De isolerede stammer blev alle i monokulturen prøvet overfor følgende hydrocarbonblandinger:

- I (cyclopentan, cyclohexan, cycloheptan)
- II (phenanthren, naphthalen, benzen)
- III (paraffinolie)
- IV olie (Shell Vitrea oil 27)

Som basissubstrat blev anvendt Colwells substrat. Hydrocarbonblandingerne blev tilsat flydende substrat i koncentrationen 1% i plastic tubes med skruelåg. Der blev anvendt følgende dyrkningstemperaturer 5° , 10° og 15° .

4. RESULTATER

4.1 RESULTATER AF KVANTITATIVE UNDERSØGELSER OVER FOREKOMST AF TOTALKIM OG OLIENEDBRYDENDE KIM

I tabellerne 9-18 er anført resultater af kvantitative undersøgelser over forekomst af totalkim, total antal gærceller/svampe, antal olienedbrydende kim og olienedbrydende gærceller/svampe.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Totalkimtal på marin agar pr. ml.	Temp. °C	Saltholdighed i %
Færingehavn	1	2676 A	Vand	82	6,3	31,57
"	2	" B	"	234	8,1	32,01
"	3	" C	"	512	7,6	31,31
"	10	" D	"	47	8,0	31,24
"	11	" E	"	33	7,9	31,27
Kigdlut Iluat	4	2677 A	Vand	6	5,9	31,75
"	5	" B	"	24	5,9	31,75
"	6	" C	"	8	6,1	31,69
Malene bugt	7	2678 A	Vand	4	5,6	31,92
"	8	" B	"	17	5,8	31,98
Godthåb	9	" C	"	6	5,7	31,94

Tabel 9. Totalkim i vand på forskellige prøvesteder.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Totalkim på marin-agar pr. g.
Færingehavn	1	2676 A	Sediment	25000
"	2	" B	"	3000
"	3	" C	"	39000
"	10	" D	"	3000
"	11	" E	"	4500
Kidglut iliat	4	2677 A	"	4700
"	5	" B	"	1300
"	6	" C	"	2800
Malenebugt	7	2678 A	"	3400
Godthåb	8	" B	"	1260
"	9	" C	"	430

Tabel 10 Totalkimtal i sediment på forskellige prøvesteder.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Total antal gærceller/ svampe pr. ml på agar-substrat
Færingehavn	1	2676 A	Vand	M
"	2	" B	"	M
"	3	" C	"	3
"	10	" D	"	M
"	11	" E	"	M
Kigdlut Ileat	4	2677 A	"	M
"	5	" B	"	6
"	6	" C	"	M
Malenebugt	7	2678 A	"	M
Godthåb	8	" B	"	7
"	9	" C	"	M

Tabel 11. Total antal gærceller/svampe i vand på forskellige prøvesteder. M = test ikke udført.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Total antal gærceller/ svampe pr. g på agar
Færingehavn	1	2676 A	Sediment	M
"	2	" B	"	M
"	3	" C	"	< 1
"	10	" D	"	M
"	11	" E	"	M
Kigdlut Ileat	4	2677 A	Sediment	M
"	5	" B	"	< 1
"	6	" C	"	M
Malene bugt	7	2678 A	Sediment	M
Godthåb	8	" B	"	< 1
"	9	" C	"	M

Tabel 12. Total antal gærceller/svampe i sediment på forskellige prøvesteder. M = test ikke udført.

Prøvested	Laborato- rie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Antal oliened- brydende bak- terier pr. l	Antal bakterier på basisagar- plader pr. l
Færingehavn	1	2676 A	Vand	1676	2000
"	2	2676 B	"	1160	M
"	3	2676 C	"	985	M
"	10	2676 D	"	50	M
"	11	2676 E	"	280	M
Kigdlut Iluat	4	2677 A	"	85	200
"	5	2677 B	"	ikke påvist	M
"	6	2677 C	"	20	M
Malene bugt	7	2678 A	"	535	800
"	8	2678 B	"	ikke påvist	M
Godthåb	9	2678 C	"	85	M

Tabel 13. Antal olienedbrydende bakterier i vand på forskellige prøvesteder. M = test ikke udført.

Prøvested	Laborato- rie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Antal oliened- brydende bak- terier pr. gr.	Antal bakterier på basisagar- plader pr. gr.
Færingehavn	1	2676 A	Sediment	20	20
"	2	" B	"	< 10	M
"	3	" C	"	30	M
"	10	" D	"	620	M
"	11	" E	"	1020	M
Kigdlut Iluat	4	2677 A	"	< 10	20
"	5	" B	"	< 10	M
"	6	" C	"	< 10	M
Malene bugt	7	2678 A	"	10	20
"	8	" B	"	30	M
Godthåb	9	" C	"	10	M

Tabel 14. Antal olienedbrydende bakterier i sediment på forskellige prøvesteder. M = test ikke udført. Basisagar = "olieagar" - olie.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Antal olienedbrydende gær-celler/svampr. pr. ml. på agar-substrat
Færingehavn	1	2676 A	Vand	M
"	2	" B	"	M
"	3	" C	"	< 10
"	10	" D	"	M
"	11	" E	"	M
Kigdlut Iluat	4	2677 A	"	M
"	5	" B	"	< 10
"	6	" C	"	M
Malene bugt	7	2678 A	"	M
"	8	" B	"	< 10
Godthåb	9	" C	"	M

Tabel 15 . Antal olienedbrydende gær-celler/svampe i vand på forskellige prøvesteder.

M = test ikke udført.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Antal olienedbrydende gær-celler/svampe pr. g på agar-substrat
Færingehavn	1	2676 A	Sediment	M
"	2	" B	"	M
"	3	" C	"	< 10
"	10	" D	"	M
"	11	" E	"	M
Kigdlut Iluat	4	2677 A	"	M
"	5	" B	"	< 10
"	6	" C	"	M
Malene bugt	7	2678 A	"	M
"	8	" B	"	< 10
Godthåb	9	" C	"	M

Tabel 16. Antal olienedbrydende gær-celler/svampe i sediment på forskellige prøvesteder.

M = test ikke udført.

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Antal olienedbrydende kim pr. l.
Færingehavn	1	2676 A	Vand	300
"	2	" B	"	< 30
"	3	" C	"	400
"	10	" D	"	< 30
"	11	" E	"	< 30
Kigdlut Iluat	4	2677 A	"	< 30
"	5	" B	"	< 30
"	6	" C	"	< 30
Malene bugt	7	2678 A	"	< 30
"	8	" B	"	< 30
"	9	" C	"	< 30

Tabel 17. Antal olienedbrydende kim i vand på forskellige prøvesteder. (MPN-undersøgelse).

Prøvested	Laboratorie nr.	Udtagn. nr.	Prøvens art	Antal olienedbrydende kim pr. g
Færingehavn	1	2676 A	Sediment	93
"	2	" B	"	9
"	3	" C	"	240
"	10	" D	"	9
"	11	" E	"	43
Kigdlut Iluat	4	2677 A	"	4
"	5	" B	"	4
"	6	" C	"	43
Malene bugt	7	2678 A	"	9
"	8	" B	"	15
"	9	" C	"	< 4

Tabel 18. Antal olienedbrydende kim i sediment på forskellige prøvesteder (MPN-undersøgelse).

4.2 RESULTATER AF KVALITATIVE UNDERSØGELSER AF ISOLEREDE, OLIEDEDBRYDENDE BAKTERIESTAMMER

I tabel 19 er gengivet bakteriestammer, som er isoleret fra medier med olie som eneste kulstofkilde. Stammerne repræsenterer både vand og sediment, ligesom de er repræsentative for såvel Færingehavn, Kigdlut Iluat og Malenebugt.

De i tabel 19 isolerede stammer er undersøgt dels med henblik på en initial biokemisk-taxonomisk vurdering (se tabel 20.) og dels overfor forskellige hydrocarbonblandinger ved forskellige temperaturer (se tabellerne 21-24).

Stamme nr.	Laboratorie nr.*	Isoleret fra vand/sediment
26 ₁	1	Sediment
26 ₂	1	"
43	6	"
46	6	"
139	7	"
139 ₁	7	"
139 ₂	7	"
222a	6	"
224 ₁	6	"
224 ₂	6	"
268	3	"
280	3	"
283	3	"
284	3	"
332	4	"
334 hv	4	"
334 gul	4	"
336 ₁	4	"
336 ₂	4	"
345A	5	"
351C	5	"
355A ₁	5	"
355A ₂	5	"
355A ₃	5	"
360	6	"
392 ₁	10	"
392 ₂	10	"
423	3	"
424	3	"
425	3	"
428	3	"
436	7	"
437	7	"
439	7	"
458	11	"
604	1	Vand
633	2	"
635	7	Sediment
640	2	Vand
642 ₁	2	"
645	2	"
646	2	"
671	4	"
689	7	"
809	2	"
810	2	"
811 ₁	2	"
811 ₂	2	"

* Vedrørende laboratorie nr. se tabellerne 9-18.

Tabel 19. Oprindelse af bakteriestammer isoleret fra substrater med anvendelse af olie som eneste kulstofkilde.

Kolonne nr.	Harotype pigment	Cytochrom oxidase	Katalase	Tween 20	Tween 80	Cetoline	O/F-test	Simon's citrat	Sim Bevegelsighed	Sim Indol H ₂ S	1% tryptone	1% tryptone + 4% salt	1% tryptone + 7% salt	C/L	Arginin	Lysin	Ureastof	NO ₃	Arabinose	Cellobiose	Laktose	Sucrose	Glycerol	Stivelse	Xylose	Chitin	KB + 1% salt v. 50°C.	KB + 1% salt v. 10°C.	KB + 1% salt v. 15°C.	KB + 1% salt v. 30°C.	Pteridin sensitiv	Geen		
26 ₁	-	+	+	+	+	-	gl-	-	(+)	-	+	+	+	M	-	-	+	+	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	-	g- stav		
26 ₂	-	-	+	-	-	-	gl-	-	-	-	+	+	+	M	-	-	+	+	M	M	M	M	-	-	-	-	(+)	+	+	+	-	g- stav		
43	+	+	+	+	+	+	Ol	-	(+)	-	-	+	+	-	-	-	-	+	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	(+)	+	+	+	g- stav		
46	-	+	+	+	+	+	Ol	-	(+)	-	-	+	+	-	-	-	-	+	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav		
139	-	-	-	-	-	+	gl-	-	-	-	+	(+)	-	M	-	-	+	+	M	M	M	M	-	M	-	-	-	+	(+)	+	+	gramlabil stav-		
139 ₁	-gul	-	-	+	+	-	F	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	-	(+)	(+)	-	g- stav	
139 ₂	+gul	-	-	+	+	-	gl-	-	-	-	+	+	+	M	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	-	-	(+)	(+)	+	g- stav	
222a	-	-	-	-	-	-	Ol	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	+	-	-	+	(+)	+	+	g- stav	
224 ₁	-	+	+	+	+	-	Ol	-	(+)	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	M	M	M	M	-	M	+	-	(+)	+	+	+	+	g- stav	
224 ₂	+	+	+	+	+	-	Ol	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	+	-	(+)	(+)	+	+	+	g- stav	
268	-rd	-	+	+	+	-	gl-	-	-	-	+	(+)	(+)	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	-	(+)	(+)	+	(+)	g- coc.	
283	+	-	-	+	+	+	gl-	-	-	-	(+)	-	-	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	(+)	+	g- stav	
283	-hvid	-	+	+	+	-	F	-	-	-	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	g- coc.-	
284	+	+	-	+	+	+	F	-	-	-	(+)	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
332	+gul	+	+	-	+	+	gl-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
334	-hvid	-	+	+	+	+	F	-	-	-	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+	g- stav	
334	-gul	+	-	-	-	-	Ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	-	g- stav	
336 ₁	+	-	+	+	+	-	F	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	(+)	g- stav	
336 ₂	+gul	-	+	(+)	(+)	-	gl-	-	-	-	+	+	(+)	M	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	-	+	+	+	+	g- stav	
345A	+	+	+	+	+	+	Ox	+	-	-	+	+	(+)	-	(+)	-	(+)	+	M	M	M	M	M	+	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
351C	+	+	+	+	+	+	Ox	+	-	-	+	+	(+)	-	+	-	(+)	+	M	M	M	M	M	+	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
355A	+	+	-	+	+	+	Ox	+	-	-	+	+	(+)	-	+	-	+	+	M	M	M	M	M	(+)	M	-	-	(+)	+	+	+	-	g- stav	
355A	+	+	-	-	-	+	Ox	+	-	-	+	+	(+)	-	+	-	+	(+)	M	M	M	M	M	(+)	M	-	-	(+)	+	+	+	-	g- stav	
355A	-	+	-	-	-	-	gl-	+	+	-	(+)	+	+	M	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	+	+	+	+	g- stav	
360	-	+	+	-	-	-	gl-	-	-	-	(+)	+	(+)	M	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
392 ₁	+red	+	+	-	-	-	F	-	-	-	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	(+)	(+)	+	-	g- stav		
392 ₂	+	-	+	+	+	-	gl-	-	-	-	+	+	(+)	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	(+)	(+)	+	-	g- stav	
423	+	-	-	+	+	+	Ox	-	-	-	+	+	+	-	+	-	(+)	+	M	M	M	M	M	(+)	M	-	-	+	(+)	(+)	+	+	g- stav	
424	+	+	+	+	+	+	Ox	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	M	M	M	M	(+)	M	-	-	+	+	+	+	-	g- stav	
425	+	+	+	+	+	+	Ox	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	M	M	M	M	(+)	M	-	-	+	+	+	+	-	g- stav	
428	+	+	+	+	+	+	Ox	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	M	M	M	M	M	(+)	M	-	-	+	+	+	+	-	g- stav
436	+	+	+	+	+	+	gl-	-	-	-	+	-	-	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	+	+	+	(+)	g- stav	
437	+gul	-	+	-	-	+	gl-	-	-	-	+	-	-	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+	g- stav	
439	+	+	-	+	+	-	Ox	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav
458	-gul	+	-	-	+	+	Ox	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
601	-	+	+	+	+	-	Ox	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	(+)	g- stav
633	-gul	-	+	(+)	(+)	+	gl-	-	-	-	+	+	+	M	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	+	+	+	+	g- coc.	
635	-brun	+	+	+	+	+	gl-	-	-	-	(+)	+	(+)	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	-	gramlabil coc.	
640	-	-	+	+	+	+	gl-	-	(+)	-	-	+	+	M	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	g- stav	
642 ₁	+	-	+	+	(+)	-	Ox	-	-	-	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav
645	-	+	+	+	+	-	gl-	+	(+)	-	-	+	+	M	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	+	+	+	-	g- stav
646	-	+	+	+	+	-	gl-	+	-	-	-	+	+	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	-	M	-	-	+	+	+	+	-	g- stav	
671	+	+	+	+	+	+	gl-	-	-	-	-	+	-	M	-	-	-	-	M	M	M	M	M	+	M	-	-	+	+	+	+	+	g- stav	
689	+	+	+	+	+	+	Ox	-	-	-	(+)	+	+	-	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	-	(+)	(+)	+	+	g- stav
801	-	+	-	(+)	-	-	gl-	-	-	-	+	(+)	(+)	M	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	+	+	+	-	g- stav
811	-brun	+	-	+	+	+	F	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	g- stav	
811 ₁	-	+	-	+	+	-	gl-	-	(+)	-	-	+	+	M	-	-	-	+	+	M	M	M	M	M	-	M	-	-	(+)	+	+	+	-	g- stav
811 ₂	-gul	-	-	-	-	-	F	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	g- stav	

M = test ikke udført
gl = glucosenegativ
Ox = oxidativ nedbrydning af glucose
(+) = svag reaktion

Alle aflæsninger fuldført indenfor 7 dage

Tabel 20. Biokemisk undersøgelse af bakteriestammer isoleret fra substrat med olie som eneste kulstofkilde.

Bakterie stamme	5°C.			10°C.			15°C.		
	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger
26 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
268	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
283	-	-	-	-	-	-	-	-	-
284	-	-	-	-	-	-	-	-	-
332	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
334hv.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
334gul	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
345A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
351C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
360	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
423	-	-	-	-	-	-	-	-	-
424	-	-	-	-	-	-	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	-	-	-
428	-	-	-	-	-	-	-	-	-
436	-	-	-	-	-	-	-	-	-
437	-	-	-	-	-	-	-	-	-
439	-	-	-	-	-	-	-	-	-
458	-	-	-	-	-	-	-	-	-
604	-	-	-	-	-	-	-	-	-
633	-	-	-	-	-	-	-	-	-
635	-	-	-	-	-	-	-	-	-
640	-	-	-	-	-	-	-	-	-
642	-	-	-	-	-	-	-	-	-
645	-	-	-	-	-	-	-	-	-
646	-	-	-	-	-	-	-	-	-
671	-	-	-	-	-	-	-	-	-
689	-	-	-	-	-	-	-	-	-
809	-	-	-	-	-	-	-	-	-
810	-	-	-	-	-	-	-	-	-
811 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
811	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = visuel olienedbrydning

(+) = tvivlsom olienedbrydning

- = ingen olienedbrydning

Tabel 21. Isolerede olienedbrydende bakteriers vækst i blanding af cycloalkaner under anvendelse af forskellige temperaturer og tider.

Bakterie stamme	5°C.			10°C.			15°C.		
	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger
26 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
268	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-
283	-	-	-	-	-	-	-	-	-
284	-	-	-	-	-	-	-	-	-
332	-	-	-	-	-	-	-	-	-
334hv.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
334gul	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
345A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
351C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₃	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-
360	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
423	-	-	-	-	-	-	-	-	-
424	-	-	-	-	-	-	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	-	-	-
428	-	-	-	-	-	-	-	-	-
436	-	-	-	-	-	-	-	-	-
437	-	-	-	-	-	-	-	-	-
439	-	-	-	-	-	-	-	-	-
458	-	-	-	-	-	-	-	-	-
604	-	-	-	-	-	-	-	-	-
633	-	-	-	-	-	-	-	-	-
635	-	-	-	-	-	-	-	-	-
640	-	-	-	-	-	-	-	-	-
642 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
645	-	-	-	-	-	-	-	-	-
646	-	-	-	-	-	-	-	-	-
671	-	-	-	-	-	-	-	-	-
689	-	-	-	-	-	-	-	-	-
809	-	-	-	-	-	-	-	-	-
810	-	-	-	-	-	-	-	-	-
811 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
812 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = visuel olienedbrydning
 (+) = tvivlsom olienedbrydning
 - = ingen olienedbrydning

Tabel 22. Isolerede olienedbrydende bakteriers vækst i blanding af aromatiske hydrocarboner under anvendelse af forskellige temperaturer og tider.

Bakterie stamme	5°C.			10°C.			15°C.		
	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger
26 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 ₂	-	-	(+)	-	+	+	-	(+)	+
43	-	-	-	-	+	+	-	+	+
46	-	-	-	-	+	+	-	+	+
139	-	-	-	-	+	+	-	+	+
139 ₁	-	-	-	-	-	+	-	+	+
139 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224 ₁	-	-	-	-	+	+	-	+	+
224 ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-
268	-	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)
283	-	-	-	-	-	-	-	-	-
284	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+
332	-	-	-	-	-	-	-	+	+
334hv.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
334gul	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336 ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
345A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
351C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₁	-	-	-	-	-	-	+	+	(+)
355A ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	+
355A ₃	-	-	-	-	-	+	+	+	+
360	(+)	(+)	(+)	-	-	(+)	-	-	-
392 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₂	-	-	-	-	+	+	-	(+)	+
423	-	-	-	-	-	-	-	-	-
424	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	-	-	-
428	-	-	-	-	-	-	-	-	-
436	-	-	-	-	-	-	-	-	+
437	-	-	-	-	-	-	-	-	-
439	-	-	-	-	+	+	-	-	+
458	-	-	-	-	-	-	-	-	-
604	-	-	-	-	-	-	-	-	+
633	-	-	-	-	+	+	-	-	+
635	-	-	-	-	-	-	-	-	-
640	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+
642	-	-	-	-	-	-	-	-	-
645	-	-	-	-	-	-	+	+	+
646	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
671	-	-	-	-	+	+	-	-	(+)
689	-	-	-	-	-	-	-	-	-
809	-	-	-	-	-	-	-	-	-
810	-	-	-	-	-	-	+	+	+
811 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
811 ₂	-	-	-	-	+	-	-	+	+

+ = visuel olienedbrydning
 (+) = tvivlsom olienedbrydning
 - = ingen visuel olienedbrydning

Tabel 23. Isolerede olienedbrydende bakteriers vækst i blanding af alkaner under anvendelse af forskellige temoeraturer og tider.

Bakterie stamme	5°C.			10°C.			15°C.		
	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger	≤ 2 uger	≤ 3 uger	6 uger
26 ₁	-	-	-	-	(+)	+	+	+	+
26 ₂	-	-	-	-	-	+	-	+	-
43	-	-	-	-	-	+	-	+	+
46	-	-	-	-	-	-	-	+	+
139	-	-	-	-	-	+	+	+	+
139 ₁	-	(+)	+	-	-	(+)	(+)	+	+
139 ₂	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
222a	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-
224 ₁	-	-	-	-	-	+	-	+	+
224 ₂	-	-	-	-	-	(+)	-	+	+
268	-	-	-	-	-	-	-	-	+
280	-	-	-	-	-	-	-	-	+
283	-	-	-	-	-	-	-	-	-
284	-	-	-	-	-	-	-	+	+
332	-	-	-	-	-	(+)	-	+	+
334hv.	-	-	(+)	-	-	+	+	+	+
334gul	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
336 ₁ hv.	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-
336 ₂ gul	-	-	-	-	-	-	-	-	+
345A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
351C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
355A ₂	-	-	-	-	-	-	+	+	+
355A ₃	-	-	-	-	+	+	+	+	+
360	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
392 ₂	-	-	-	-	-	-	-	+	+
423	-	-	-	-	-	-	+	+	+
424	-	-	-	-	-	-	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	-	-	-
428	-	-	-	-	-	-	-	-	-
436	-	-	-	-	-	(+)	-	+	+
437	-	-	-	-	-	-	-	-	-
439	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
458	-	-	-	-	-	-	-	-	-
604	-	-	-	-	-	-	-	-	-
633	-	-	-	-	-	-	-	-	+
635	-	-	-	-	-	+	-	-	+
640	-	-	-	-	-	+	+(1 uge)	+	+
642 ₁	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+
645	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
646	-	-	-	-	-	-	-	+	+
671	-	-	-	-	-	-	-	-	-
689	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
809	-	-	-	-	-	-	-	-	-
810	-	-	-	-	-	-	+	+	+
811 ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
811 ₂	-	-	-	-	-	+	+	+	+

+ = visuel olienedbrydning

(+) = tvivlsom olienedbrydning

- = ingen visuel olienedbrydning

Tabel 24. Isolerede olienedbrydende bakteriers vækst i blanding af alkaner, cycloalkaner, aromatiske hydrocarboner (Shell Vitrea oil 27) under anvendelse af forskellige temperaturer og tider.

5. DISKUSSION OG KONKLUSION

De mikrobiologiske undersøgelser refererer, som det fremgår af tabellerne, til enkelte prøveserier. Det statistiske grundlag for en vurdering af den mikrobiologiske situation i Færingehavn, Kigdlut Iluat og Malenebugt (se figur 1) er således særdeles beskedent og frister til forsigtighed med hensyn til konklusioner.

Den mikrobiologiske situation på omtalte lokaliteter viser, at mikrofloraen såvel i vand som i sediment er relativt sparsom /48/, og at den initiale lag-fase ved olienedbrydning alene af denne grund kan forventes lang. De herskende temperaturer vil yderligere forlænge lag-fasen (se figur 5a og 5b og tabellerne 21-24). Disse faktorer antyder, at oliespild i de pågældende områder må forventes at henligge i længere tid uden at blive mikrobielt omdannet, end oliespild i næringsrige estuarier placeret under varmere himmelstrøg. En egentlig estimering af lag-fasen under naturlige forhold på basis af monokulturforsøg (se tabellerne 21-24) vil næppe kunne foretages med sikkerhed. Monokulturforsøg i laboratoriet afspejler ikke 100% de aktuelle arbejdsbetingelser for den blandede bredspektrede mikroflora i naturen. Den af De Klerk et al. /35/ demonstrerede betydning af co-oxidation viser, at blandingskulturer som de forefindes i naturen vil udgøre et mere effektivt enzymmatisk udbud end monokulturer konfronteret med udvalgte fraktioner af olie.

Tabellerne 9 - 18 og tabellerne 19 - 24 viser, at olienedbrydende bakterier er påvist på alle 3 prøvesteder (Færingehavn, Kidglut Iluat og Malenebugt). De mikrobiologiske forudsætninger for olienedbrydning synes således opfyldt i området, men vidtgående slutninger fra en enkelt prøveserie må frarådes. En sikker kvalitativ og kvantitativ vurdering af de mikrobiologiske forhold i området må hvile på flere undersøgelser. Det må dog konkluderes (jfr. tabel 17 og 18) at der ved MPN-undersøgelsen alene er fundet olienedbrydende bakterier i Færingehavn.

Forsøg med isolerede, olienedbrydende bakterier i monokulturforsøg viste, at evnen til at nedbryde olie var signifikant bedre ved 15°C end ved 10°C og 5°C. (sml. tabellerne 22-26). Under laboratoriebetingelser med optimale næringsbetingelser viste isolerede bakterier ikke visuel olienedbrydning i de første 3 uger ved 5°C og 10°C i monokulturforsøg. Lægges her- til at der ved laboratorieforsøg anvendes langt større inocula af olienedbrydende bakterier end naturen kan byde på ved naturlig nedbrydning af oliespild, kan lag-fasen befrygtes længere i naturen end i laboratoriet, hvor denne nølefase ved temperaturer < 10°C er af størrelsesordenen 3-4 uger, afhængig af art af bakterier og sammensætning af olien. Mens igangsættelsen af olienedbrydning i naturen er en langsom proces vil en igangværende mikrobiel olienedbrydning i naturen favoriseres af, at toksiske produkter (f.eks. fedtsyrer) fjernes fra de mikrobiologisk aktive grænseflader mellem vand og olie.

Forgæringsreaktionerne i tabel 20 har ikke muliggjort en sikker taxonomisk inddeling af isolerede olienedbrydende bakterier. Det væsentlige formål med forgæringsundersøgelserne i tabel 20 var at dokumentere hvorvidt olienedbrydende humanpatogene eller

fiskepatogene bakterier kunne påvises i området. Forgæringsresultaterne viser, at humanpatogene bakterier ikke er isoleret ved disse foreløbige undersøgelser, uanset mange humanpatogene bakterier ikke blot vides at være lipolytiske, men også ved laboratorieundersøgelser er afsløret som olienedbrydende. (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* N.A.G.). Det må påregnes, at arktiske temperaturer modsat temperaturer i tropen og subtropen ikke giver nævnte humanpatogene, olienedbrydende bakterier reelle vækstmuligheder. Med hensyn til fiskepatogene bakterier kendes derimod mange arter, som kan vokse ved lave temperaturer ($3-4^{\circ}\text{C}$). Den største trussel fra disse bakterier i marine områder må påregnes at være *Vibrio anguillarum*, som i tabellen skal søges blandt fermentative bakterier (se kolonne O/F, hvor F betyder fermentativ glucoseforgæring). Tabel 20 viser, at der i materialet på 48 stammer kun er påvist 8 fermentative bakterier og at ingen af disse samtidig er argininpositive og pteridinpositive, hvilket i forbindelse med øvrige reaktioner viser, at *Vibrio anguillarum* ikke er repræsenteret i materialet. *Aeromonas*, som kan være både humanpatogen og fiskepatogen, er heller ikke påvist blandt olienedbrydende bakterier. Det kan derimod på basis af nærværende undersøgelse ikke helt udelukkes, at fiskepatogene *Flexibacter* optræder i materialet, men de *Flexibacter* som ved lave temperaturer angriber fisk er oftest angivet ikke at være salttolerante. *Flexibacter*gruppen og dens betydning for fiskesygdom er for nærværende næppe fuldt opklaret. En nærmere vurdering af isolerede stammer vil finde sted på Maryland Universitetet og må afventes med interesse (se senere).

Af 48 isolerede formodet olienedbrydende bakterier er 2 grampositive coccer, 45 gramnegative til gramlabile stave og 1 gramnegativ coccuslignende bakterie. Dominansen af gramnegative stave blandt olienedbrydende bakterier i havvand bekræfter tidligere undersøgelser. Tabel 20 antyder, at flertallet af isolerede bakterier enten forgærer glucose oxidativt eller er glucosenegative, og at flertallet endvidere er cytochromoxi-

dasepositive. Ikke bevægelige, glucosenegative eller oxidative, cytochromoxidasenegative, stavformige bakterier synes at kunne henføres til Acinetobactergruppen eller i den udstrækning de er cytochromoxidasepositive, oxidative eller glucosenegative stavbakterier, må formenes at tilhøre flavobakteriegruppen. Det må pointeres, at andre gram-negative stavbakterier end Flavobakterier kan producere gullige eller brunlige pigmenter (Xanthomonas, Pseudomonas, Erwinia, Enterobacter). Bevægelige, gramnegative, cytochromoxidasepositive, oxidative stavbakterier kan foreløbigt rubriceres under Pseudomonas, mens bevægelige, cytochromoxidasepositive, glucosenegative bakterier kan tilhøre Alcaligenesgruppen. Undersøgelsen over isolerede olienedbrydende bakterier i det arktiske område har imidlertid givet anledning til fund af mange atypiske bakterier. Dette har resulteret i en henvendelse til professor R.R. Colwell, Maryland Universitetet, om en fælles undersøgelse af nævnte stammer. Resultat heraf påregnes at foreligge senere i 1978. Det forekommer overraskende, at der i materialet ikke er flere bakterier, som opfylder kriterier for at kunne optages i Pseudomonasgruppen, idet disse oftest angives som hyppigst forekommende olienedbrydende bakterie i marine områder.

Der forekommer i tabel 20 enkelte bakterier, som ikke har afsløret lipolytiske egenskaber med Tween-tests, og som ifølge Colwells teori ikke skulle kunne nedbryde olie. Disse stammer (26₂, 222a, 334gul, 355A₂, 360, 392, 437, 633, 811₂) er isoleret fra olieagarplader. Tabellerne 21 - 24 viser, at flere af disse stammer (26₂, 222A₂, 355A₂, 633, 811₂) angriber olie i monokulturforsøg og således delvist modsiges Colwells teori.

Resultater som de fremtræder i tabellerne 9-18, bekræfter nyere teorier om at tælling af olienedbrydende kim bør foregå ved MPN-undersøgelser og ikke ved tælling på olieagar. Det fremgår af disse tabeller, at antal kolonier talt på basisagar (d.v.s. "olieagar" uden olietilsætning) oftest er større end kolonital på olieagar, hvilket antyder, at nogle bakterier enten har udnyttet urenheder i agaren som kulstof- og energikilde, eller de har direkte været i stand til at udnytte polysaccharidet agar (jfr. tabellerne 13, 14, 17 og 18). Netop ved kimtællinger i vand er det rimeligt at forvente tilstedeværelse af agarnedbrydende bakterier, eftersom agar indgår i alger, hvis totale nedbrydning således forudsætter en agarnedbrydende mikroflora.

Det fremgår af tabellerne 9-18, at koncentrationen af olienedbrydende kim i de pågældende områder har været relativt ringe (sml. afsnit 2.2.1). Ingen tællinger viste > 400 olienedbrydende bakterier/liter efter MPN-metoden. Disse lave tal viser, at ved fremtidige MPN-undersøgelser i sådanne områder må der også medtages prøvemængder af vand på 10 ml i MPN-undersøgelsen, hvor der i nærværende undersøgelse som største prøvemængde kun er medtaget 1 ml vand. Denne fremgangsmåde ville givetvis have resulteret i flere positive fund, men ville ikke ændre det faktum, at antallet af olienedbrydende bakterier bestemt ved denne ene prøveserie er ret lavt. Det statistiske materiales beskedenhed frister til forsigtighed med hensyn til endelige konklusioner med hensyn til antal olienedbrydende bakterier i området. En vurdering på basis af foreliggende resultater peger på, at der ikke foreligger en så betydelig olieforurening i området, at det har afspejlet sig i antal olienedbrydende kim i vand eller sedimenter. Kystnære strømninger kan eventuelt ændre bundforholdene således at tidligere olieforureninger af bunden er fjernet før prøveudtagelsen blev foretaget. En maskering af

situationen i bundsedimenter, som her antydtes kan alene afsløres ved undersøgelser over en tidsperiode. Foreløbigt kan det noteres, at antallet af registrerede olienedbrydende kim ikke overstiger 400/liter samt at antal olienedbrydende kim udgør < 1% af totalkim og ofte < 1 o/oo, hvilket ikke indikerer olieforurenede områder.

Det fremgår af tabellerne 15 og 16 at der ikke ved denne prøveserie blev påvist olienedbrydende svampe/gærceller, og at mængden af gærceller og svampe i området iøvrigt er særdeles beskedent, (jfr. tabellerne 9, 10, 11 og 12).

Tabellerne 21-24 viser hvordan bakterier isoleret fra 4 lokaliteter ved Grønland reagerer på forskellige hydrocarboner ved forskellige temperaturer i monokulturforsøg i laboratoriet. De i tabellerne omtalte 48 bakteriestammer er isoleret enten fra olieagar eller fra MPN-substrater med olie som eneste tilsatte kulstof- og energikilde.

Tabellerne 21-25 viser, at ingen af de isolerede bakteriestammer med sikkerhed var aktive ved omdannelse af cycloalkanblanding og blanding af aromatiske hydrocarboner, i det mindste indenfor de givne tidsrammer (6 uger). Der er imidlertid under forsøget isoleret 1 stamme (332), hvis aktivitet overfor cycloalkanblandingen ikke kan udelukkes og 1 stamme (355A₃), hvis aktivitet overfor aromatiske hydrocarboner ikke kan udelukkes.

Undersøgelserne viser, at bakteriel vækst ikke visuelt kan registreres før efter 3 ugers forløb ved 5°C og 10°C (ganske få undtagelser). Med hensyn til olie (Shell Vitrea oil 27) er der ved 15°C registreret vækst allerede efter 1 uges forløb for en enkelt bakteriestammes vedkommende. Det kan på basis af nærværende undersøgelser konkluderes, at lagfasen

ved monokulturforsøg synes afgørende større ved 5°C og 10°C end ved 15°C, og at mange af de undersøgte 48 stammer alene har udvist olienedbrydende evner ved 15°C. (jfr. tabel 24).

Sammenlignes tabel 23 og tabel 24 ses, at olie (Shell Vitrea oil 27) lettere angribes af bakterier end paraffiner, uanset de undersøgte 48 stammer hverken i blandinger af cycloalkaner eller i blandinger af aromatiske hydrocarboner har afsløret evne til at udnytte andre fraktioner i olien end alkaner (jfr. tabel 23).

Foretagne undersøgelser refererende til tabellerne 21-24 har klart vist, at aflæsning af monokulturforsøg med olienedbrydende kim ikke kan afsluttes før efter 6 uger, uanset om der anvendes temperaturer ved 5°C, 10°C eller 15°C.

Vedrørende de kvalitative bestemmelser kan det på basis af undersøgelserne konkluderes, at der fra de respektive områder er isoleret mange forskellige arter af olienedbrydende bakterier repræsenterende først og fremmest gramnegative stave, men også enkelte grampositive kokker og gramlabile stave. Generelt kan det konkluderes, at isolerede olienedbrydende bakterier i kødvandsboullion med 1% salt udviser aftagende vækst ved fallende temperaturer, således at:

vækst ved 30°C > vækst ved 15°C > vækst ved 10°C > vækst ved 5°C.

Uanset at en endelig artsbestemmelse ikke med sikkerhed kan foretages på basis af de i tabel 20 angivne kriterier, er det rimeligt at konkludere, at Acinetobacter, Flavobakterier, Pseudomonas og Mikrokokker dominerer blandt de 48 isolerede olienedbrydende bakterier.

6. REKOMMANDATIONER

Nærværende undersøgelse har medført opbygning af viden vedrørende kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af mikroflora involveret i biologisk nedbrydning af olie. Der er ved simultan anvendelse af flere metoder opnået større klarhed med hensyn til de enkelte metoders anvendelsesmuligheder og begrænsninger ved registrering af den mikrobiologiske situation.

Resultaterne opnået gennem nærværende undersøgelser peger på følgende undersøgelser:

1. Yderligere undersøgelse af de udvalgte lokaliteter samt åbne havområder af sediment og vand for at få et materiale der sikrer, at tilfældige fluktuationer ikke er udslagsgivende ved de opnåede resultater.
2. En undersøgelse af olies nedbrydning under anvendelse af naturlige inocula (vand og sediment). Under undersøgelsen foretages mikrobiologiske og gaschromatografiske undersøgelser ved forskellige temperaturer.
3. Under henvisning til iagttagelser vedrørende registreret bakteriel vækst uden tilsvarende kemiske ændringer, ønskes nævnte undersøgelser under punkt 2 udført ved forskellige koncentrationer af olie, fordi høj koncentration af olie eventuelt kan give bakteriel vækst i oliesubstrat uden at en sådan vækst nødvendigvis resulterer i så store ændringer i olien, at de kan registreres ved gaschromatografiske undersøgelser.
4. En kvalitativ undersøgelse af, hvorvidt oliens nedbrydning ledsages af en opformering af human- eller fiskepatogene bakterier, såvel under aerobe som anaerobe forhold.

7. LITTERATURLISTE

1. Jensen, V.B. og P. Johansen.
Hydrocarboner i sedimenter og marine organismer ved Vestgrønland.
Rapport til Ministeriet for Grønland, december 1977.
2. Hansen, N., V.B. Jensen og P. Johansen.
Hydrocarboner i sedimenter og marine organismer ved Færingehavn.
Rapport til Ministeriet for Grønland, januar 1978.
3. Walter, J.D. and R.R. Colwell
Microbial degradation of model petroleum at low temperatures.
Microbial Ecology 1, 1974, 63-95.
4. Calomaris, J.J., B. Austin, J.D. Walker and R.R. Colwell.
Enrichment for estuarine petroleum-degrading bacteria using liquid and solid media.
Journ. App. Bacteriology 42, 1977, 135-144.
5. Ehlers, S.E. and H.G. Hedrick.
Detection and identification of bacteria utilizing petroleum waste in dilution waters.
Dev. Ind. Microbiol. 13, 1972, 1200-1201.
6. Zobell, E.C.
Action of microorganisms on hydrocarbons.
Bact. Revy, 10, 1946, 1-49.
7. Størmer, F.C.
Microbial degradation of ecofisk oil in seawater by *saccharomycopsis lipolytica*.
Ambio 5, 1976, 141-142.

8. Mulkins-Phillips, G.J. and J.E. Stewart.
Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in
northwestern Atlantic waters and coastal sediments.
Can.Journ. Microbiol. 20, 1974, 955-962.
9. Meyers, S.P. and D.G. Ahearn.
Mycological degradation of petroleum in marine environ-
ments,
Marine Pollution and Sealife 1972. Ed.M. Rhivo. 481-485.
10. Floodgate, G.D.
Biodegradation of hydrocarbons in the sea.
Water Pollution Microbiol. (Ed. R. Mitchell). p. 153-171.
John Wiley & Sons, New York, 1972.
11. Atlas, R.M.
Fate and effects of oil pollutants in extremely cold
marine environments.
Prepared for Office Naval Research, 1974.
Distributed by Mat.Tech.Inf.Service.
12. Austin, B., J.J. Calomiris, J.D. Walker and R.R. Colwell.
Numerical Taxonomy and Ecology of petroleum-degrading
bacteria.
Appl. & Environm. Microbiol. 34, 1977, 60-68.
13. Atlas, R.M. and R. Bartha.
Abundance, distribution and oil biodegradation potential
of microorganisms in Raditan Bay.
Environm. Poll. 4, 1973, 291-300.
14. Bunch, J.N. and R.C. Harland.
Biodegradation of crude petroleum by the indigenous microbial
flora of the Beaufort Sea.
Technical Report No. 10, March 1976.

15. Mills, A.L., C. Brecil and R.R. Colwell.
Enumeration of petroleum degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method.
In press.
16. Gibson, T.A.
The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons.
Crit.Rev.Microbiol. 1, 1971, 199-223.
17. Kator, H. and R. Herwig.
Microbial responses after two experimental oil spills in an eastern coastal plain estuarine ecosystem.
Proc. Oil Spill Conference 1977, New Orleans, Louisiana, 517-522.
18. Kristensen Krongaard K.
De marine vibriopopulationers forhold til kulhydratforurening af marine biotoper.
Rapport fra Vandkvalitetsinstituttet, 1976.
19. Minchew, C. Douglas and J.D. Yarborough.
The occurrence of Fin Rot in mullet associated with crude oil contamination of an estuarine pond-ecosystem.
Journ.Fish.Biol. 10, 1977, 319-323.
20. Atlas, R.M. and R. Bertha.
Fate and effects of pollution in the marine environment.
Residue Rev. 1973, 49-85.
21. Donoghue, N.A. M. Griffin, D.B. Norris and P.W. Trudgill.
The microbial metabolism of cyclohexane and related compounds.
Proc. 3rd Intern.biodegrad.Symp. 1976. Appl. Science Publ.Ltd. London.

22. Bayly, R.C. and G.J. Wigmore.
Metabolism of phenol and cresols by mutants of *Pseudomonas*
Journ. Bact. 113, 1973, 1112-1120.
23. Crow, S.A., W.L. Cook, D.G. Ahearn and A.W. Bourquin.
Microbial population in coastal surface slicks.
Proc. 3rd Internat. Biodegrad. Symp. Ed. J.H. Sharpley and
A.M. Kaplan.
Appl. Science Publ. London, 1976.
24. Wodzinski, R.S. and D. Bartoloni.
Physical state in which naphthalene and bibenzyl are utilized
by bacteria.
Appl. Microbiol. 23, 1972, 1077-81.
25. Gibson, D.T.
Microbial degradation of hydrocarbon.
Physical and chemical Science Research Report 1.
Ed. D. Goldberg: The nature of seawater.
26. Johnson, M.J.
Utilization of hydrocarbons by microorganisms.
Chem. and Industry. Sept. 1964, 1532-1537.
27. Olivieri, R. P. Bacchin, A. Rbertillo, N. Oddo, L. Degen and
A. Tonolo.
Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-re-
lease fertilizer.
Appl. & Environm. Microbiol. 31, 1976, 629-634.
28. Zobell, C.E.
Bacterial degradation of mineral oils at low temperatures.
The microbial degradation of oil pollutants.
Ed.: D.G. Ahearn og S.P. Meyers.
Center Wetland Resources, Publication No. LSU-SG-73-01.
Louisiana State U. Boston Rouge. 1973, 153-161.

29. Atlas R.M. and R. Bertha.
Biodegradation in seawater at low temperatures.
Can.Journ. Microbiol. 18, 1972, 1851-1855.
30. Blumer, M. H.L. Sanders, J.F. Grassle and G.R. Hampson.
A small oil spill.
Environment 13, 1971, 1-12.
31. Schwarz J.R., J.D. Walker and R.R. Colwell.
Deep-sea bacteria: Growth and utilisation of n-hexadecane
at in situ temperature and pressure.
Can.Journ. Microbiol. 21, 1975, 682-687.
32. Lee, R.R. and C. Ryan.
Biodegradation of petroleum hydrocarbons by marine microbes.
Proc. 3rd Intern. Biodegr.Symp. 1976. Appl. Science Publ.Ltd.
London.
33. Karrick, L.N.
Alteration in petroleum resulting from physico-chemical and
microbiological factors.
Chapter 3 in: Effects of petroleum on arctic and subarctic
marine environments and organisms. Vol. 1. Nature and fate
of petroleum. Ed. by D.C. Malins. Academic Press Inc.
New York, San Francisco, London 1977.
34. Payne, J.F.
Mixed function oxidasis in the marine organisms in relation
to petroleum hydrocarbon metabolism and detection.
Marine Poll. Bulletin, 8, 1977, No. 5, 112.
35. De Klerk, H. and A.C. Van Der Linden.
Bacterial degradation of cyclohexane. Participation of a
co-oxidation reaction.
Autonic van Leeuwenhook. 40, 1974, 7-15.

36. Walker, J.D., J.J. Calomiris, T.L. Herbert and R.R. Colwell.
Petroleum hydrocarbons: Degradation and growth potential for
Atlantic Ocean sediment bacteria.
Marine Biology 34, 1976, 1-9.
37. IMCO/FAO/UNESCO/WHO/IAEA/LN.
Joint group of experts on the scientific aspects of marine
pollution.
Reports and Studies No. 6. 1977. Chapter 2.
38. Mc. Auliffe, C.D.
Surveillance of the marine environment for hydrocarbons.
Marine Science Communications, 2, 1976, 13-42.
39. Colwell, R.R.
Personlig meddelelse.
40. Walker, J.C. and R.R. Colwell.
Long chain n-alkanes occurring during microbial degradation
of petroleum.
Can.Journ.Microbiol. 22, 1976, 886-891.
41. Walker, J.D. and R.R. Colwell.
Enumeration of petroleum by an alga, *Prototheca zophii*.
Appl. Microbiol. 30, 1975, 79-81.
42. Walker, J.D. and R.R. Colwell.
Enumeration of petroleum-degrading microorganisms.
Appl. & Environm. Microbiol. 31, 1976, 198-207.

43. Baruah, J.N., Y. Alroy and R.I. Mateles.
Incorporation of liquid hydrocarbons into agar media.
Appl. Microbiol. 15, 1967, 961.
44. Funk, H.B. and T.A. Krulwich.
Preparation of clear silica gels that can be streaked.
Journ.Bact. 88, 1964, 1200-1201.
45. Seki, H.
Silica gel medium for enumeration of petroleumlytic micro-organisms in the marine environment.
Appl. Microbiol. 26, 1973, 318-320.
46. Kristensen Krongaard, K.
Bakteriologiske og parasittologiske miljøundersøgelser
ved Gyllingnæs og eksisterende danske kraftværker.
Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, København 1975.

BILAG 1

Marinagar

Bacto-pepton	5 g g
Bacto-gærekstrakt	1 g
FeCl ₃	0.1 g
NaCl	19.45 g
Na ₂ SO ₄	3.24 g
MgCl ₂	8.8 g
CaCl ₂	1.8 g
KCl	0.55 g
NaHCO ₃	0.16 g
KBr	0.08 g
SrCl ₂	0.034 g
H ₃ BO ₃	0.022 g
Na ₂ SiO ₃	0.004 g
NaF	0.0024 g
NH ₄ NO ₃	0.0016 g
Na ₂ HPO ₄	0.008 g
Bacto-agar	15 g

Ved brug tilsættes 55.1 g substrat til 1000 ml koldt destilleret vand og der opvarmes til kogning for at opløse substratet. Sterilisation ved 121°C i 15 minutter og pH indstilles på 7.6

BILAG 2

Anvendte agarsubstrat (ad modum Colwell):

NaCl	24 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.7 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	3.0 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g
Agar	15 g

Stofferne opløses i 1 liter destilleret vand

pH indstilles på 7.1 efter sterilisation ved 115°C i 10 minutter.

BILAG 3

2 g kaliumnitrat, 1 g magnesiumsulfat, 3 mg phenolrødt og 10 ml olie tilsættes 1 liter destilleret vand, 10 g silicagel (100-200 mesh) opløses i 100 ml 7% KOH under opvarmning. Saltopløsning og kaliumsilikatopløsning fordeles separat i 50 ml portioner i erlenmeyerkolbe og autoklaveres ved 121°C i 15 min. Efter saltopløsningen er afkølet tilsættes 0.5 ml 10% KH_2PO_4 og 1 ml 20% phosphorsyre. Silicatopløsning og saltopløsning blandes hurtigt (størkner hurtigt) og hældes på plader før størkning. pH bør ligge omkring 7.8 for at undgå uønsket størkning af mediet.

BILAG 4

Bunch-substrat til MPN-tælling:

NaCl	5.53 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	2.54 g
KCl	0.1 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.37 g
Tris buffer (Sigma)	7.69 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g

1.0 ml chleret metolopløsning (se nedenstående)

1.0 liter destilleret vand

pH justeres til 7.8

Chleret metolopløsning anvendt i Bunch-substrat har følgende sammensætning:

CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.004 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.004 g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1.0 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.3 g
MnSO ₄ , H ₂ O	0.6 g
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.15 g
E.D.T.A.	6.0 g

Stofferne opløses i 1 liter destilleret vand.

pH justeres til 7.5.

BILAG 5

Colwell-substrat til MPN-tælling:

NaCl	24 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.7 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	3.0 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g

Stofferne opløses i 1 l destilleret vand.

pH indstilles på 7.1 efter sterilisation ved 115°C i 10 minutter.